

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE

PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU GRADE DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (BIOPHYSIQUE)

PAR
MARC BRULLEMANS

"ÉTUDE DES POTENTIELS ÉLECTROSTATIQUES
DE MEMBRANES ASYMÉTRIQUES DU TYPE MONTAL-MUELLER :
CONTRIBUTIONS EXPÉRIMENTALES ET THÉORIQUES."

DÉCEMBRE 1991

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

AVANT-PROPOS

La vie consiste à en apprendre un peu plus chaque jour me disait mon grand-père lorsque j'étais adolescent. J'ai appris beaucoup tout au long de mes études graduées. Je ne parle pas seulement de connaissances strictement académiques mais de connaissances générales sur le fonctionnement de la recherche, son mode de pensée, sa culture. Naturellement cela débouchait parfois sur des réflexions plus vastes touchant la société, qu'elle soit du passé ou de l'avenir, sur le sens de l'humain. Tenter d'en apprendre un peu plus chaque jour...

Certains êtres m'ont appris même certaines choses de l'ordre des qualités et des sentiments. Je fais référence ici à "mes" membranes. «Les bicouches Montal-Mueller: école de vie», ne serait-ce pas un titre approprié pour une thèse ? En effet, elles m'ont appris patience, douceur, persévérance, humilité aussi. J'ai appris lentement à les connaître. Je leur ai ensuite parlé, tout comme l'on parle à de vieilles amies. Je les ai aimées les jours de fête, je les ai maudites les jours de guerre. Bien que toujours tentant de les faire jumelles, que de fois suis-je demeuré estomaqué devant leur idiosyncrasie. Quelles capricieuses ! Cette tendre guerre constitue vraiment la toile de fond du présent travail.

Cette thèse est le résultat de travaux effectués sous la bienveillance du professeur P. Tancrede du département de chimie-biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières. Son jugement, son sens de la mesure, - autant au niveau scientifique, académique qu'à tout autre niveau -, m'ont toujours fasciné et dans la mesure de mon possible, j'ai tenté de les faire miennes. Je lui suis aussi reconnaissant de sa confiance et de l'amitié qu'il m'a toujours témoignées.

J'aimerais remercier tout particulièrement Normand Denicourt et Hélène Chabot avec lesquels j'ai pu discuter tout mon soûl de membranes, de potentiels et de tout thème s'y rattachant. Ce travail porte la marque de ces nombreux et fructueux échanges.

J'aimerais remercier également M. Francois Lamarche. Peut-être sera-t-il le premier surpris d'apparaître ici mais je tiens à souligner qu'il fut depuis mes premières années à l'UQTR mon biophysicien modèle, celui qui sans le savoir, de par ses intérêts, sa façon de voir, sa façon de faire, m'a grandement influencé. Il a toute ma sympathie.

J'aimerais remercier ceux qui m'ont plus particulièrement appuyé durant les derniers kilomètres. En premier lieu, M. Adel F. Antippa avec lequel j'ai passé d'interminables soirées à discuter du jour où je commencerai à rédiger ma thèse mais aussi - encore plus tard la nuit ! - de potentiels normalisés et de paramètres d'asymétrie. Dans un même souffle, j'aimerais remercier M. Jean-Joseph Max. Ses connaissances en électromagnétisme et son expérience de recherche ont maintes fois assuré mes pas. Puis, encore une fois, un grand merci à Hélène Chabot. Elle fut une confidente de rêve pour un thésard ne sachant s'il court un marathon ou un 100 mètres. Finalement, un petit sourire à Nathalie Gauthier qui m'a aimablement tapé la majeure partie de mes références. Non vraiment, je ne saurai assez vous remercier.

À Pierre Lavigne, mon réveille-matin perfectionné, le boute-en-train accompli du laboratoire, je lui dois d'excellents moments... et une bonne poignée de main. Comme à tout ceux qui, ne serait-ce que pour une heure, ont fait du laboratoire Tancrede une inqualifiable marmite où s'entremêlent larmes, fous rires, réflexions profondes et actions d'éclat. Une expérience diabolique, dirait l'ami Lavigne.

Finalement, à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont appuyé tout au cours de ces années de soutenu labeur, je vous dis un grand merci.

RÉSUMÉ

Le potentiel transmembranaire originant de membranes asymétriques est un paramètre susceptible d'affecter de nombreuses fonctions membranaires. Les bicouches reconstituées selon la technique de Montal-Mueller constituent un objet de choix pour une telle étude. Ce travail est consacré à la mesure des potentiels membranaires de bicouches phospholipidiques modèles de ce type. Dans ce but, des courbes courant-tension (I-V) de bicouches dopées avec un transporteur, en l'occurrence la nonactine, furent effectuées. Cette méthode permet non seulement d'évaluer le potentiel transmembranaire mais de caractériser la barrière de potentiel sur toute l'épaisseur de la membrane.

Le volet théorique de ce travail a consisté dans un premier temps à examiner les différentes contributions à cette barrière de potentiel. À la lumière des informations recueillies, un profil de barrière de géométrie trapézoïdale fut retenu comme modèle. Dans un deuxième temps, deux approches théoriques, celles de Nernst-Planck et de Eyring furent appliquées à ce modèle de barrière. Des expressions inédites du courant en fonction de la tension furent obtenues. Pour des raisons inhérentes aux théories en question, l'approche de Nernst-Planck fut retenue. Plusieurs équations reliées à la forme de la courbe I-V, en particulier à son asymétrie furent dérivées. Un paramètre d'asymétrie normalisé ne dépendant en première approximation que de la différence de potentiel aux deux coins du trapèze fut mis à jour.

Quinze courbes I-V provenant de bicouches dopées à la nonactine (une bicouche symétrique et quatorze bicouches asymétriques) furent approximées selon le modèle de Nernst-Planck et autant de barrières trapézoïdales furent caractérisées. Il en ressort que les coins 1 et 2 du trapèze sont situés à la même distance de l'interface. La barrière de potentiel montre donc une symétrie par rapport au centre de la membrane, fût-elle asymétrique. Les hauteurs de la barrière de potentiel furent estimés autour de 300 mV. Quant à la mesure de la différence de potentiel entre les deux coins du trapèze, elle put être évaluée avec

précision, tout comme la position relative de ces coins par rapport à l'épaisseur de la barrière. Moyennant certaines approximations, il fut possible de calculer à partir de ces valeurs les différences de potentiel transmembranaire existant de part et d'autre de la bicouche. La corrélation de ces mesures avec les valeurs prédites par la théorie de Gouy-Chapman-Stern ne s'est pas révélée pleinement satisfaisante, en grande partie dû au fait que les profils obtenus varient notablement d'une bicouche à l'autre.

Cette variabilité entre bicouches de même composition (systématiquement passée sous silence dans la littérature) se retrouve également au niveau des mesures de conductance à faible tension et des mesures de capacité. Différentes hypothèses furent avancées afin de rationaliser ces écarts à première vue étonnants. L'une de ces hypothèses fait appel à la présence de micelles inverses dans la zone de transition située à la périphérie de la partie bilipidique. La plupart, sinon toutes, font référence cependant au mode de formation unique de la bicouche Montal-Mueller. Très peu d'études ont été consacrées à ce mode de formation.

Différentes observations et indications laissent à penser que la bicouche une fois formée est très sensible aux conditions initiales, et toujours particulières, prévalant au moment de sa formation. L'hypothèse récente voulant que la bicouche Montal-Mueller se forme selon un processus d'amincissement semblable aux films bilipidiques noirs semble peu probable au vu des observations au binoculaire et des mesures de capacité présentées.

2.1.1	Potentiel dû à la double couche électrique ou potentiel de Gouy	32
2.1.1.1	Notion de double couche électrique.....	32
2.1.1.2	Théorie de Gouy-Chapman.....	35
2.1.1.3	Inconsistance fondamentale de la théorie de Gouy-Chapman	39
2.1.1.4	Autres limitations de la théorie de Gouy-Chapman.....	41
2.1.1.5	De la couche diffuse de Gouy et Chapman.....	44
2.1.1.6	... à la théorie de Gouy-Chapman-Stern.....	45
2.1.1.7	Théorie de Gouy-Chapman-Stern. Généralités.....	46
2.1.1.8	Théorie de Gouy-Chapman-Stern	47
2.1.1.9	Ionisation à la surface et sites d'adsorption	50
2.1.1.10	Mise en oeuvre de la théorie de Gouy-Chapman-Stern	52
2.1.1.11	Limitations de la théorie de Gouy-Chapman-Stern	52
2.1.1.12	Profil intramembranaire du potentiel dû aux doubles couches.....	53
2.1.2	Potentiel dipolaire	57
2.1.2.1	Généralités	57
2.1.2.2	Origine du potentiel dipolaire	57
2.1.2.3	Aparté sur la mesure des potentiels à l'interface air-eau	59
2.1.2.4	Grandeur et conséquence du potentiel dipolaire	61
2.1.2.5	Modélisation du potentiel dipolaire	62
2.1.2.6	Importance biologique du potentiel dipolaire	66
2.1.2.7	Potentiel de Gouy et potentiel dipolaire.....	67
2.1.3	Énergie de Born et force image.....	69
2.1.4	Potentiel de distribution	73
2.1.5	Énergie potentielle dite neutre.....	74
2.1.6	Barrière d'énergie potentielle totale	76
2.1.7	Superposition d'un potentiel extérieur à la barrière d'énergie totale	78
2.2	Problématique de l'utilisation d'un transporteur comme sonde de potentiel.....	82
2.2.1	Mécanisme d'action d'un transporteur.....	82
2.2.2	Choix de la nonactine	86
2.3	Approches théoriques du transport ionique	90
2.3.1	Survol des approches théoriques	90
2.3.2	Approche de Nernst-Planck	91
2.3.2.1	Dérivation de l'équation de Kramers	91
2.3.2.2	Procédés d'inversion de la courbe I-V.....	97
2.3.2.3	Choix du profil de la barrière de potentiel	98

2.3.2.4	Intégration de l'équation de Kramer pour un profil trapézoïdal.....	102
2.3.2.5	Étude analytique de l'expression $I(V)$ selon Nernst-Planck.....	103
2.3.2.5.1	Abscisse à l'origine.....	103
2.3.2.5.2	Levée des indéterminations.....	104
2.3.2.5.3	Expression tronquée.....	107
2.3.2.5.4	Première dérivée.....	107
2.3.2.5.5	Asymétrie de la relation $I(V)$	109
2.3.3	Approche de Eyring.....	115
2.3.3.1	Dérivation sommaire de l'équation de Eyring.....	115
2.3.3.2	Application de la théorie au processus de diffusion.....	118
2.3.3.3	Cas d'une seule barrière de diffusion.....	118
2.3.3.4	Cas d'une barrière trapézoïdale.....	121
2.3.3.5	Etude analytique de l'expression $I(V)$ selon Eyring.....	122
2.3.3.5.1	Calcul de la première dérivée de $I(V)$	123
2.3.3.5.2	Calcul de la seconde dérivée de $I(V)$	128
2.3.3.5.3	Etude de l'asymétrie de la courbe $I-V$	130
2.3.4	Comparaison des approches de Nernst-Planck et de Eyring.....	133
2.3.4.1	Rapport des courants.....	133
2.3.4.2	L'approche de Eyring vue comme cas particulier de celle de Nernst-Planck.....	135
2.3.5	Prédictions numériques de l'expression de Nernst-Planck.....	136
CHAPITRE III MATÉRIEL, MONTAGES ET MÉTHODOLOGIES.....		138
3.1	Description du montage expérimental.....	138
3.1.1	Bain de préparation de bicouches.....	139
3.1.2	Circuits électroniques.....	144
3.1.2.1	Circuit de mesure de la capacité membranaire.....	146
3.1.2.2	Circuit de mesure de la conductance membranaire.....	148
3.1.3	Acquisition des données à l'ordinateur.....	152
3.1.4	Électrodes.....	154
3.1.4.1	Préparation des électrodes $Ag/AgCl$	154
3.1.4.1.1	Préparation du fil d'argent.....	154
3.1.4.1.2	Chloruration des électrodes.....	155
3.1.4.1.3	Vieillessement et conservation des électrodes.....	158
3.1.4.2	Propriétés électriques des électrodes-maison.....	158
3.2	Méthodologies.....	160
3.2.1	Procédés de nettoyage.....	160
3.2.2	Perforation de l'orifice.....	161
3.2.3	Conditionnement de l'orifice.....	164
3.2.4	Assemblage des bassins et fabrication de la bicouche.....	165

3.2.5	Prise des mesures électriques	166
3.2.5.1	Circuit électrique équivalent du montage	166
3.2.5.2	Mesure de la capacité membranaire spécifique	168
3.2.5.3	Mesure de la conductance membranaire spécifique	170
3.2.5.4	Méthodologie de la prise de mesure	173
3.2.6	Extraction de la barrière d'énergie	174
3.3	Matériel et produits	177
3.3.1	Eau.....	177
3.3.2	Produits chimiques	178
3.3.2.1	Sels	178
3.3.2.2	Lipides.....	178
3.3.2.3	Autres produits.....	181
3.3.2.4	Solvants, bases et acides	181
CHAPITRE IV	OBSERVATIONS	184
4.1	Formation de la bicouche Montal-Mueller	184
4.1.1	Jeu des niveaux d'eau.....	187
4.1.2	Observations au stéréomicroscope	190
4.1.2.1	Observations reliées au mode de formation.....	190
4.1.3	Effet de fermeture.....	192
4.2	Stabilité et facilité de formation des bicouches	194
4.2.1	Nature du lipide	194
4.2.2	Nature de l'enduit.....	197
4.2.3	Nature du support	198
4.3	Retour sur le mode de formation de la bicouche Montal-Mueller.....	198
CHAPITRE V	RÉSULTATS ET DISCUSSION	202
5.0	Introduction.....	202
5.1	Mesures de capacité de bicouches phospholipidiques pures	203
5.1.0	Généralités sur la mesure de capacité	203
5.1.1	Mesures préliminaires de la capacité spécifique	204
5.1.2	Effet de l'épaisseur du support sur la capacité	206
5.1.3	Mesures de capacité de bicouches de différentes compositions	208
5.1.4	Variabilité des mesures de capacité	209
5.2	Mesures de conductance de bicouches phospholipidiques pures	211
5.2.0	Généralités.....	211

5.2.1 Mesures de conductance de bicouches de différentes compositions.....	212
5.2.2 Mécanisme de la conduction au travers d'une bicouche lipidique.....	216
5.2.3 Observations de sauts de conductance	216
5.3 Courbes I-V de bicouches phospholipidiques pures	218
5.4 Conductance à faible tension de bicouches phospholipidiques dopées à la nonactine	226
5.4.1 Variabilité des mesures de conductance.....	229
5.4.2 Détermination du potentiel de Gouy	231
5.5 Courbes I-V de bicouches phospholipidiques dopées.....	233
5.6 Caractérisation des barrières de potentiels.....	243
5.6.1 Caractérisation typique d'une barrière de potentiel à partir d'une courbe I-V	243
5.6.2 Ensemble des barrières de potentiel caractérisées.....	253
5.6.3 Étude de la fiabilité du procédé d'extraction de la barrière de potentiel	257
5.6.4 Comparaison des résultats avec Schoch & coll.....	264
5.7 Potentiels transmembranaires mesurés et prédits selon la théorie de Gouy-Chapman-Stern	267
CHAPITRE VI CONCLUSION.....	273
Tour d'horizon des principaux résultats.....	276
Un dernier mot	278
BIBLIOGRAPHIE.....	279
ANNEXE 1 Circuit électronique détaillé de la mesure de capacité	308
ANNEXE 2 Circuit électronique détaillé de la mesure courant-tension	309
ANNEXE 3 Programme d'extraction de la barrière d'énergie trapézoïdale	310
ANNEXE 4 Article sur l'effet de l'épaisseur du support	319

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Patron d'asymétrie lipidique de quelques membranes plasmiques et intracellulaires	9
Tableau 2	Caractéristiques principales de la nonactine.....	88
Tableau 3	Capacité spécifique de membranes asymétriques PE/PS formées sur des supports d'épaisseur différentes	206
Tableau 4	Mesures de capacité de bicouches phospholipidiques pures	209
Tableau 5	Mesures de conductance de bicouches lipidiques pures.....	214
Tableau 6	Conductance normalisée de bicouches dopées à la nonactine.....	229
Tableau 7	Valeurs de n_1 et n_2 avec quatre paramètres variables ($n_2 \neq 1 - n_1$)	254
Tableau 8	Barrières trapézoïdales extraites des 15 courbes I-V (avec $n_2 = 1 - n_1$)	255
Tableau 9	Rapport entre les paramètres d'asymétrie et les mesures de $\Delta\psi_d$	258
Tableau 10	Comparaison de la barrière trapézoïdale obtenue avec celle de Schoch & coll. (1979)	266
Tableau 11	Paramètres utilisés pour calculer les potentiels dus à la double couche électrique	268
Tableau 12	Comparaison entre les mesures de $\Delta\psi_d$ obtenues et les valeurs de $\Delta\psi_{DC}$ calculées à l'aide de la théorie de Gouy-Chapman-Stern.....	269
Tableau 13	Valeurs des paramètres des barrières extraites dans la littérature ($n_1+n_2=1$)	277

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.	– Illustration d'une membrane biologique. Modèle de Singer & Nicolson. (Tiré de Bretscher, 1985).....	4
Figure 1.2.	– Illustration d'une membrane biologique. Modèle plus élaboré que celui de Singer & Nicolson. (Tiré de Israëlchvilli, 1978).....	6
Figure 1.3.	– Insertion voltage-dépendant de la protéine M13 de E. coli. (Tiré de Kuhn & coll., 1986)	15
Figure 1.4.	– Mécanisme présidant à l'ouverture du canal sodique. Modèle du glissement voltage-dépendant de l'hélice S4. (Tiré de Catterall & coll., 1986)	16
Figure 1.5.	– Modèle dit «barrel stave» du processus d'excitation de l'alaméthicine. (Tiré de Laprade, 1977)	18
Figure 1.6.	– Formation d'une bicouche asymétrique selon la technique de Montal-Mueller	24
Figure 2.1.	– Illustration des doubles couches électriques bordant une membrane. (Tiré de Cevc, 1990)	34
Figure 2.2.	– Effet de l'adsorption ionique spécifique sur le profil du potentiel électrostatique. (Tiré de Overbeek & Lijklema, 1959)	48
Figure 2.3.	– Illustration en B d'un potentiel transmembranaire créé par une asymétrie des doubles couches électriques. (Tiré de Clementz & coll., 1988)	56
Figure 2.4.	– Illustration du potentiel dipolaire d'une bicouche lipidique symétrique. (Tiré de Donovan, 1979).....	64

Figure 2.5.	– Illustration du potentiel de Gouy et du potentiel dipolaire d'une bicouche lipidique symétrique. (Tiré d'Andersen, 1978, p.386)	68
Figure 2.6.	– Illustration de l'énergie de Born et de l'énergie associée à la force-image. (Tiré de Läuger, 1987)	72
Figure 2.7.	– Profil de l'énergie potentielle "neutre". (Tiré de Flewelling & Hubbell, 1986b)	77
Figure 2.8.	– Barrière d'énergie potentielle totale calculée pour un ion liposoluble de 0,42 nm de rayon. (Tiré de Flewelling & Hubbell, 1986b)	79
Figure 2.9.	– Schéma général du mécanisme d'action d'un transporteur neutre. (Tiré de Ciani & coll., 1973)	85
Figure 2.10.	– Structure de la nonactine	89
Figure 2.11.	– Structure cristalline du complexe nonactine- K^+	89
Figure 2.12.	– Modèle de barrière utilisé par Hall & coll. pour extraire le profil d'énergie potentielle de bicouches symétriques. (Tiré de Hall & coll., 1973)	99
Figure 2.13.	– Barrière de potentiel extraite de courbes I-V provenant de films noirs de PE d'origine bactérienne. (Tiré de Hall & coll., 1973)	99
Figure 2.14.	– Courbe I-V d'une barrière de potentiel trapézoïdale symétrique prédite par la théorie de Nernst-Planck	105
Figure 2.15.	– Courbe I-V d'une barrière de potentiel trapézoïdale asymétrique prédite par la théorie de Nernst-Planck	106
Figure 2.16.	– Graphique de la conductance (dynamique, statique et approchée) en fonction de la tension V, selon l'approche de Nernst-Planck	110
Figure 2.17.	– Courbe de seconde dérivée de la fonction I(V) d'une barrière de potentiel trapézoïdale asymétrique (approche de Nernst-Planck)	111
Figure 2.18.	– Graphique du rapport de rectification R en fonction de V (approche de Nernst-Planck)	113
Figure 2.19.	– Courbe I-V d'une barrière de potentiel trapézoïdale symétrique prédite par la théorie de Eyring	124
Figure 2.20.	– Courbe I-V d'une barrière de potentiel trapézoïdale asymétrique tel que prédit par la théorie de Eyring	125

Figure 2.21. – Graphique de la conductance dynamique en fonction de la tension V pour une barrière asymétrique (approche de Eyring)	127
Figure 2.22. – Courbe de seconde dérivée de la fonction I(V) d'une barrière de potentiel trapézoïdale asymétrique tel que prédit par la théorie de Eyring.....	129
Figure 2.23. – Graphique du rapport de rectification R en fonction de V (approche de Eyring) pour trois barrières trapézoïdales asymétriques.....	132
Figure 3.1. – Schéma global du montage utilisé pour fabriquer des bicouches Montal-Mueller	140
Figure 3.2. – Dessin, à l'échelle, du bain de bicouches (vue de haut)	142
Figure 3.3. – Schéma du porte-membrane et du support hydrophobe	143
Figure 3.4. – Vue en perspective du bain de bicouches. (Inspiré de Robert & Tancrède, 1991)	145
Figure 3.5. – Schéma-bloc du circuit de mesure de la capacité membranaire. (Le circuit électronique complet apparaît à l'annexe 1)	147
Figure 3.6. – Schéma-bloc du circuit de mesure courant-tension. (Le circuit électronique complet apparaît à l'annexe 2)	151
Figure 3.7. – Diagramme simplifié du montage servant à la chloruration des électrodes	156
Figure 3.8. – Caractéristiques courant-tension des électrodes maison.....	159
Figure 3.9. – Schéma de l'outil servant à la perforation de l'orifice (vue de côté).	163
Figure 3.10. – Caractéristiques I-V d'un circuit électrique simulant une bicouche lipidique: performance comparée des instruments de mesure du courant	172
Figure 3.11. – Protocole, sous forme d'algorithme, de la prise de mesures des propriétés électriques membranaires.....	175
Figure 3.12. – Structure de la tête polaire des principaux phospholipides utilisés	179
Figure 3.13. – Structure et principales caractéristiques du squalène.....	182
Figure 4.1. – Mode de formation d'une bicouche Montal-Mueller. Schéma original de Montal. (Tiré de Montal, 1974).....	186

Figure 4.2.	– Mode de formation d'une bicouche Montal-Mueller (Inspiré de White & coll., 1976)	189
Figure 4.3.	– Mode de formation d'une bicouche Montal-Mueller. Hypothèse de Niles & coll. (Tiré de Niles & coll., 1988)	200
Figure 5.1.	– Enregistrement en fonction du temps du courant traversant une bicouche phospholipidique asymétrique.....	213
Figure 5.2.	– Enregistrement en fonction du temps de la conductance à faible tension d'une bicouche phospholipidique asymétrique. Observation de sauts de conductance.....	217
Figure 5.3.	– Courbe I-V d'une bicouche phospholipidique symétrique (tracé original).....	220
Figure 5.4.	– Courbe I-V d'une bicouche phospholipidique symétrique (traitement à l'ordinateur)	221
Figure 5.5.	– Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique montrant une asymétrie positive ($R > 1$).....	223
Figure 5.6.	– Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique montrant une asymétrie négative ($R < 1$).....	225
Figure 5.7	– Enregistrement en fonction du temps de la conductance à faible tension d'une bicouche phospholipidique asymétrique dopée à la nonactine. Ajouts successifs de transporteur	228
Figure 5.8.	– Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique dopée à la nonactine montrant une asymétrie positive.....	234
Figure 5.9.	– Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique dopée à la nonactine montrant une asymétrie négative.....	236
Figure 5.10.	– Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique dopée à la nonactine. Excursion à haute tension.....	238
Figure 5.11.	– Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique dopée à la nonactine. Effet du rapport de concentration d'ions K^+	241
Figure 5.12.	Courbe I-V expérimentale approximée à l'aide de l'expression 2.35 (approche de Nernst-Planck) avec $n_1 = 1 - n_2$	247
Figure 5.13.	– Graphique de l'écart-type τ en fonction des paramètres normalisés P/P_{opt}	249

- Figure 5.14. – Comparaison des courbes I-V prédites par les expressions exacte (éq. 2.35) et approchée (éq. 2.37) de la théorie de Nernst-Planck 251
- Figure 5.15. – Graphique de R en fonction de V illustrant l'effet de ne considérer que la partie centrale de la barrière trapézoïdale (courbe #881106B3) 252
- Figure 5.16. – Graphique du rapport de rectification R pris à +150 mV en fonction des valeurs de $\Delta\psi_d$ extraites des courbes I-V. (Les données numériques apparaissent au tableau 9) 259
- Figure 5.17. – Graphique du paramètre d'asymétrie A à +150 mV en fonction de $|\Delta\psi_d|$. (Les données numériques apparaissent au tableau 9) 260
- Figure 5.18. – Graphique illustrant l'effet de la longueur de la section centrale du trapèze (n_2-n_1) sur le rapport de rectification..... 262
- Figure 5.19. – Graphique du paramètre d'asymétrie A* à +150 mV en fonction de $|\Delta\psi_d|$. (Les données numériques apparaissent au tableau 9) 263
- Figure 5.20. – Graphique du paramètre d'asymétrie A à +150 mV en fonction de $|\Delta\psi|$. (Les données numériques apparaissent au tableau 9)..... 265

LISTE DES ABRÉVIATIONS

DOPE	:	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOPG	:	dioléoylphosphatidylglycérol
DOPS	:	dioléoylphosphatidylsérine
DOPC	:	dioléoylphosphatidylcholine
DPG	:	diphosphatidylglycérol
DPhPC	:	diphytanoylphosphatidylcholine
DPPC	:	dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPE	:	dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
DPPG	:	dipalmitoylphosphatidylglycérol
DSPC	:	distéaroylphosphatidylcholine
FCCP	:	carbonylcyanide p-trifluorométhoxyphénylhydrazone
FRAP	:	retour de fluorescence après photoaveuglement
GDO	:	glycéroldioléate
GMO	:	glycérolmonooléate
PA	:	acide phosphatidique
PC	:	phosphatidylcholine
PE	:	phosphatidyléthanolamine
PEB	:	phosphatidyléthanolamine d'origine bactérienne
PG	:	phosphatidylglycérol
PI	:	phosphatidylinositol
PS	:	phosphatidylsérine
RPE	:	spectroscopie de résonance paramagnétique électronique
SM	:	sphingomyéline
TPB-	:	tétraphénylborate

LISTE DES PRINCIPAUX SYMBOLES

A^*	: paramètre d'asymétrie normalisé (-)
A_M	: aire de la bicouche Montal-Mueller (m^2)
C	: capacité du condensateur plan (F)
C	: concentration de l'ion liposoluble dans la phase aqueuse ($mol \cdot m^{-3}$)
$C_i(x)$: concentration de l'ion i à une distance x ($mol \cdot m^{-3}$)
$C_i(\infty)$: concentration de l'ion i dans le coeur de phase ($mol \cdot m^{-3}$)
C_i^W	: concentration ionique dans la phase aqueuse ($mol \cdot m^{-3}$)
C_{is}^M	: concentration interfaciale de complexes ($mol \cdot m^{-3}$)
C_{is}^W	: concentration de complexes dans la phase aqueuse ($mol \cdot m^{-3}$)
C_M	: capacité de la bicouche Montal-Mueller (F)
C^M	: concentration de complexes à un point x à l'intérieur de la membrane ($mol \cdot m^{-3}$)
$C_d(0)$: concentration à la surface de contre-ions divalents ($mol \cdot m^{-3}$)
$C_m(0)$: concentration à la surface de contre-ions monovalents ($mol \cdot m^{-3}$)
C_s	: capacité membranaire spécifique ($F \cdot m^{-2}$)
C_s^W	: concentration de transporteur dans la phase aqueuse ($mol \cdot m^{-3}$)
D	: coefficient de diffusion de la particule dans le milieu ($m^2 \cdot s^{-1}$)
D^M	: coefficient de diffusion du complexe à l'intérieur de la membrane ($m^2 \cdot s^{-1}$)
d	: distance entre les plans de charges ou longueur du dipôle effectif (m)
d	: distance sur laquelle l'étape de translocation s'effectue (m)
d	: distance sur laquelle le potentiel appliqué varie (m).
d	: épaisseur de la région de permittivité ϵ_M (m)
d	: épaisseur de la barrière de potentiel (m)
δ	: distance entre l'ion liposoluble et son contre-ion (m)
δ_{HC}	: épaisseur de la région hydrocarbonée (m)
$\Delta\varphi$: différence de potentiel adimensionnel entre les deux coins de la barrière trapézoïdale (-)
$\Delta\varphi_d$: différence de potentiel adimensionnel rapportée sur toute l'épaisseur d (-)
Δn	: distance adimensionnelle entre les deux coins du trapèze ($= n_2 - n_1$)
e	: charge élémentaire ($= 1,602\,189 \cdot 10^{-19} C$)

ϵ_0	: permittivité du vide ($= 8,854\ 188\ \text{pF}\cdot\text{m}^{-1}$)
ϵ_{HC}	: permittivité relative du milieu hydrocarboné (-)
ϵ_{M}	: permittivité relative du milieu où s'adsorbe l'ion (-)
ϵ_{M}	: permittivité relative du milieu diélectrique entre les plaques (-)
ϵ_{W}	: permittivité relative du milieu aqueux (-)
\mathcal{F}	: constante de Faraday ($= 96\ 484,6\ \text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$)
G_{m}	: conductance membranaire (S)
G_{s}	: conductance membranaire spécifique ($\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$)
γ	: rapport de la concentration de complexes à $x = d$ sur celle à $x = 0$ (-)
γ_{is}	: coefficient de partage du complexe (-)
γ_{s}	: coefficient de partage du transporteur libre (-)
h	: constante de Planck ($= 6,626\ 176 \cdot 10^{-34}\ \text{J}\cdot\text{s}^{-1}$)
I_{EY}	: courant traversant la membrane selon la théorie de Eyring (A)
I_{M}	: courant traversant la membrane (A)
I_{NP}	: courant traversant la membrane selon la théorie de Nernst-Planck (A)
J	: flux de complexes au travers de la membrane ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
J_i	: flux de particules i selon la direction du mouvement ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
φ	: potentiel intrinsèque adimensionnel (-)
φ^*	: potentiel intrinsèque adimensionnel englobant la constante K (-)
φ'	: potentiel total adimensionnel (-)
φ''	: potentiel total adimensionnel englobant la constante K (-)
φ_1	: hauteur de la barrière de potentiel à la position $x = n_1 d$ (-)
φ_2	: hauteur de la barrière de potentiel à la position $x = n_2 d$ (-)
$\varphi^{\text{M}}(x)$: potentiel adimensionnel à une position x à l'intérieur de la membrane (-)
φ_{max}	: hauteur maximale de la barrière de potentiel de diffusion (-)
k	: constante de Boltzmann ($= 1,380\ 66 \cdot 10^{-23}\ \text{J}\cdot\text{K}^{-1}$)
K_{A}^{W}	: constante de complexation ion-transporteur dans la phase aqueuse ($\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)
K_{d}	: constante d'adsorption du cation divalent D sur le site P^- ($\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)
K_{EY}	: constante regroupant plusieurs paramètres expérimentaux (A)
K_{m}	: constante d'adsorption du cation monovalent M sur le site P^- ($\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)
K_{NP}	: constante regroupant plusieurs paramètres expérimentaux (A)
κ	: inverse de la longueur de Debye (m^{-1})
m_i	: mobilité mécanique molaire de la particule i dans le milieu ($\text{mol}\cdot\text{s}\cdot\text{kg}^{-1}$)
n	: densité superficielle des dipôles (m^{-2})
n_{max}	: position du maximum de la barrière (-)
n_1	: position du premier coin du trapèze (-)
n_2	: position du second coin du trapèze (-)

N_A	: nombre d'Avogadro ($= 6,022\,045 \cdot 10^{23}$ molécules \cdot mol $^{-1}$)
p	: composante perpendiculaire du moment dipolaire net (C \cdot m)
R	: constante des gaz parfaits ($= 8,3144$ J \cdot mol $^{-1}\cdot$ K $^{-1}$)
R	: rapport de rectification (–)
R^*	: rapport de rectification normalisé pour γ (–)
r_i	: rayon de l'ion (m)
$\rho(x)$: densité volumique de charge à une distance x (C \cdot m $^{-3}$)
S	: surface de l'ion en contact avec l'environnement hydrophobe (m 2)
σ	: densité superficielle de charges (C \cdot m $^{-2}$)
T	: température (K)
τ	: coefficient de transmission (–)
u_i	: mobilité mécanique de la particule i dans le milieu (s \cdot kg $^{-1}$)
U_B	: énergie de Born (J)
U_Y	: énergie potentielle de distribution (J)
U_I	: énergie potentielle "image" (J)
U_N	: énergie potentielle neutre (J)
$\tilde{\mu}_i$: potentiel électrochimique de l'ion i (J \cdot mol $^{-1}$)
$\tilde{\mu}_i^0$: potentiel électrochimique standard de l'ion i (J \cdot mol $^{-1}$)
V	: potentiel appliqué de part et d'autre de la membrane (V)
v	: potentiel appliqué adimensionnel (–)
v_0	: potentiel appliqué du côté gauche ou cis (–)
v_d	: potentiel appliqué du côté droit ou trans (–)
v_i	: vitesse stationnaire des particules i (m \cdot s $^{-1}$)
x	: distance à partir de l'interface de gauche (m)
x	: distance entre l'ion et l'interface diélectrique la plus proche (m)
$\langle x \rangle$: distance moyenne parcourue par la particule diffusante (m)
$\psi(x)$: potentiel électrostatique à une distance x de l'interface (V)
ψ	: potentiel intrinsèque de la barrière (V)
ψ'	: potentiel total que ressent l'ion (V)
ψ''	: potentiel total que ressent l'ion englobant la constante K (V)
ψ_D	: potentiel dipolaire (V)
$\psi_{DC}(x)$: potentiel à une distance x à l'intérieur de la membrane dû à la présence des d.c.e. (V)
$\psi''_{DC}(0)$: potentiel de Gouy à la surface du côté gauche à $x = 0$ (V)
$\psi'_{DC}(d)$: potentiel de Gouy à la surface du côté droit à $x = d$ (V)
ψ_Y	: potentiel de distribution (V)
Z	: valence du complexe traversant la membrane (–)
Z_i	: valence de l'ion i (–)

Équivalences pratiques:

$$RT/\mathfrak{F} = kT/e = 25,52 \text{ mV } (23^{\circ}\text{C})$$

$$10 RT/\mathfrak{F} (25^{\circ}\text{C}) = 256,8 \text{ mV} = 24,78 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1} = 5,923 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$kT/h = 6,171\cdot 10^{12} \text{ Hz } (23^{\circ}\text{C})$$

$$1 \text{ Debye} = 3,335\,641\cdot 10^{-30} \text{ C}\cdot\text{m}^{-1}$$

$$1 \text{ charge élémentaire}\cdot\text{nm}^{-2} = 0,160\,219 \text{ C}\cdot\text{m}^{-2}$$

" Ce qui est bien connu, justement parce que bien connu, n'est pas connu. "

- HEGEL

" Là où est le danger, croît aussi ce qui sauve. "

- HOLDERLIN

" La vraie force de l'esprit se mesure au degré d'incertitude qu'il est capable de supporter. "

- NIETZSCHE

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Structure et fonctions des membranes biologiques

"The barrier between life and death is only two molecules thick."

- Gabor Szabo (1982)

Les membranes biologiques sont des structures essentielles au fonctionnement des êtres vivants. Tout être vivant est composé de cellules et chacune de ces cellules est entourée d'une membrane périphérique appelée membrane plasmique. Les organites intracellulaires (réticulum endoplasmique, dictyosomes, lysosomes, etc.) sont eux-mêmes entourés d'une membrane et souvent de deux membranes (mitochondries et chloroplastes, par exemple). Certains organites impliqués dans les processus de conversion d'énergie montrent aussi de nombreux repliements accroissant d'autant la surface membranaire. On peut même retrouver chez certaines cellules spécialisées un troisième niveau d'organisation membranaire, les organites eux-mêmes contenant des structures limitées par une membrane. Les thylakoïdes des chloroplastes constituent un exemple de ce type. Les cellules se révèlent donc des structures hautement compartimentées et les surfaces membranaires peuvent prendre des valeurs considérables. Ainsi on peut estimer à 110 000 μm^2 la surface membranaire d'un hépatocyte typique de 5000 μm^3 de volume (Alberts & coll., 1983).

Des nombreux rôles qu'assurent les membranes au niveau cellulaire, deux s'imposent par eux-mêmes. Premièrement, les membranes jouent le rôle d'enveloppe, de barrière permettant d'isoler le milieu intracellulaire du milieu extérieur ou encore le milieu intérieur d'un organe intracellulaire du milieu cytoplasmique. L'intégrité de la cellule (ou de l'organe intracellulaire) dépend de l'existence (et de l'intégrité) de cette membrane. Mais l'on sait aussi que tout être vivant, et toute cellule aussi, constitue un système ouvert, échangeant continuellement de la matière, de l'énergie, de l'information avec son environnement. Les membranes sont précisément les structures régissant ces échanges. Les membranes constituent donc des barrières isolant différents milieux mais des barrières dont la perméabilité est sélective et variable dans le temps. Les cellules, tout comme à un autre niveau les organes et les organismes, peuvent être vues comme des systèmes auto-régulés et les membranes plasmiques et intracellulaires participent étroitement à ces processus de régulation.

À ces fonctions générales, associées aux membranes, s'ajoutent différentes fonctions spécifiques. Les membranes, par l'intermédiaire du cytosquelette, donnent forme à la cellule; elles jouent donc un rôle dans la morphologie cellulaire. Elles sont aussi à la base des processus de croissance, de différenciation et de reconnaissance cellulaires, des phénomènes d'endocytose et d'exocytose aussi. La transmission de l'information (communication intra- et intercellulaire), la transmission de l'influx nerveux (ou, de manière générale, tout phénomène d'excitabilité cellulaire) transitent, se manifestent au niveau de ces structures bidimensionnelles. La membrane peut aussi jouer le rôle de milieu réactionnel organisé pour certaines réactions enzymatiques. Les mécanismes de conversion énergétique (phosphorylation oxydative, phase lumineuse de la photosynthèse) constituent des exemples bien étudiés de ce type de fonction. La liste pourrait s'allonger et le lecteur intéressé aurait avantage à se référer à l'excellente monographie de Jain (1988).

Les membranes biologiques sont composées essentiellement de protéines et de lipides, constituants auxquels se greffent parfois des résidus glucidiques. Les protéines assurent les fonctions spécifiques de la membrane. On les range habituellement en cinq classes: les pompes, les canaux, les récepteurs, les enzymes et les protéines du cytosquelette. Le rôle des glycolipides et des glycoprotéines demeure mal connu bien que l'hypothèse voulant que ces molécules soient impliquées dans les processus de reconnaissance cellulaire fasse aujourd'hui pratiquement l'unanimité. Quant au rôle lipidique, il apparaît parfois bien

effacé... il est encore fréquemment question de “matrice lipidique” et de “barrière lipidique”. Mais s’il ne s’agissait que d’un milieu passif, pourquoi la nature aurait-elle fait preuve d’autant d’originalité pour des constituants somme toute “mineurs” ? Il n’est pas rare de retrouver dans une membrane donnée plus de cent espèces lipidiques... Nous verrons à la prochaine section que ces lipides peuvent influencer, moduler, réguler l’activité des protéines et par là même influencer, moduler, réguler les différentes fonctions membranaires. La membrane biologique forme un tout et nous ne pouvons donner prépondérance à un constituant en particulier.

Passons maintenant à l’organisation spatiale de la membrane. Depuis le début des années ’20, différents modèles membranaires ont été proposés (pour une vue globale des différents modèles membranaires, citons la claire et concise monographie de Mazliak, 1987). Le dernier modèle en date est celui de Singer & Nicolson appelé aussi modèle de la mosaïque fluide. Selon ce modèle, la membrane biologique, que ce soit celle entourant la cellule ou celle limitant les organites intracellulaires, est formée essentiellement d’une double couche lipidique fluide dans laquelle “baignent” et “flottent” les protéines intrinsèques et extrinsèques (Singer & Nicolson, 1972; Singer, 1974). Un schéma de ce modèle membranaire se retrouve à la **figure 1.1**. En plus de spécifier clairement la manière dont les protéines membranaires s’assemblent dans la membrane, ce modèle a l’avantage de fournir une image dynamique de la membrane, une image où les lipides et les protéines peuvent très rapidement se déplacer latéralement, tourner sur eux-mêmes, etc. Le modèle de Singer & Nicolson tient compte aussi du fait que les deux côtés de la membrane biologique ne sont pas identiques, autrement dit qu’il existe une asymétrie membranaire.

Le modèle de Singer & Nicolson présuppose toutefois que les protéines et les lipides constituent une solution idéale où chacun des principaux composants diffuse de manière libre et indépendante dans le plan de la membrane. Au cours des années ’70 et ’80, un nombre toujours grandissant de données expérimentales nous a mené à une conception un peu plus complexe de la membrane. Ainsi, si nous regardons la surface membranaire, nous constatons que ses constituants ne sont pas répartis uniformément; il existe des domaines, des agrégats de différentes compositions (Karnovsky & coll., 1984). Ces domaines peuvent exister à grande échelle, la membrane de la bactérie *Halobacterium halobium* constitue un bon exemple, ou à une petite échelle, prenons les microdomaines lipidiques en exemple.

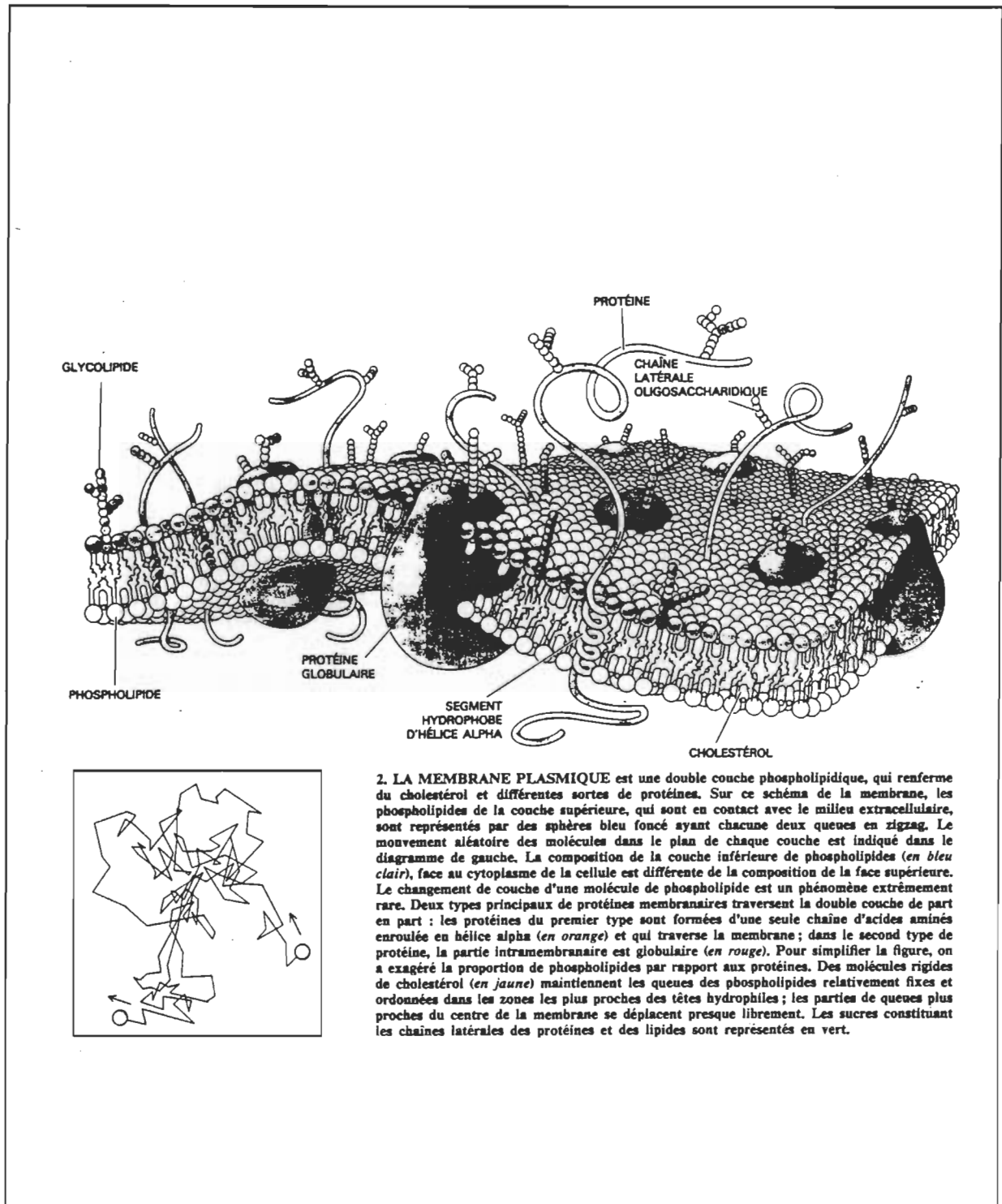


Figure 1.1. – Illustration d'une membrane biologique. Modèle de Singer & Nicolson. (Tiré de Bretscher, 1985).

La membrane biologique est donc latéralement hétérogène. L'existence de barrières de diffusion latérale, que ce soit au niveau des jonctions serrées de la cellule épithéliale, du cil connectif du bâtonnet rétinien, des jonctions gliales-axonales du neurone myélinisé ou encore de l'anneau terminal du spermatozoïde, crée également des inhomogénéités latérales que l'on pourrait qualifier ici d'absolues. Il existe aussi des régions membranaires où l'on retrouve des domaines protéiques quasi-cristallins (électroplaques, densités post-synaptiques par exemple) ou encore, si on regarde à des endroits moins bien "caractérisés", des gradients latéraux de la concentration protéique (voir Almers & Stirling, 1984). Les différents lipides peuvent former, disions-nous, des domaines membranaires se déplaçant à une vitesse donnée dans le plan de la membrane («plate-tectonics model»). Ces microdomaines constituent des entités dans lesquelles se partitionnent plus ou moins favorablement les protéines membranaires et formant, lipides et protéines ensemble, des unités coopératives. L'hétérogénéité latérale se présente donc à diverses échelles (macro-, microhétérogénéité) et sous différentes formes (protéique, lipidique, absolue, graduelle). Le schéma de la membrane, présenté à la **figure 1.2**, tient un peu mieux compte de cette complexité. (Pour de plus amples informations sur l'hétérogénéité latérale, nous proposons les revues de Grant, 1983 et Jain, 1983).

1.2 Asymétrie de la membrane biologique

Transversalement, la membrane présente deux visages disions-nous un peu plus haut. En effet, depuis le début des années '70, de nombreuses (mais délicates) études biochimiques montrent que la composition du feuillet interne de la bicouche diffère de celle du feuillet externe: la membrane biologique est donc dite asymétrique en composition (transversalement étant sous-entendu ici). Outre ces études sur la composition biochimique de chacun des feuillets, différents arguments militent en faveur de l'asymétrie membranaire. Mentionnons le fait que certaines cellules montrent une polarité bien marquée. Ainsi la cellule épithéliale de l'intestin pompe sur sa face apicale le glucose de la lumière de l'intestin vers l'intérieur de la cellule et le transporte, ensuite, sur la face opposée, de l'intérieur de la cellule vers le vaisseau sanguin. Le glucose est donc transporté vectoriellement de part et d'autre de la cellule, et de part et d'autre de chacune des membranes impliquées dans ce processus.

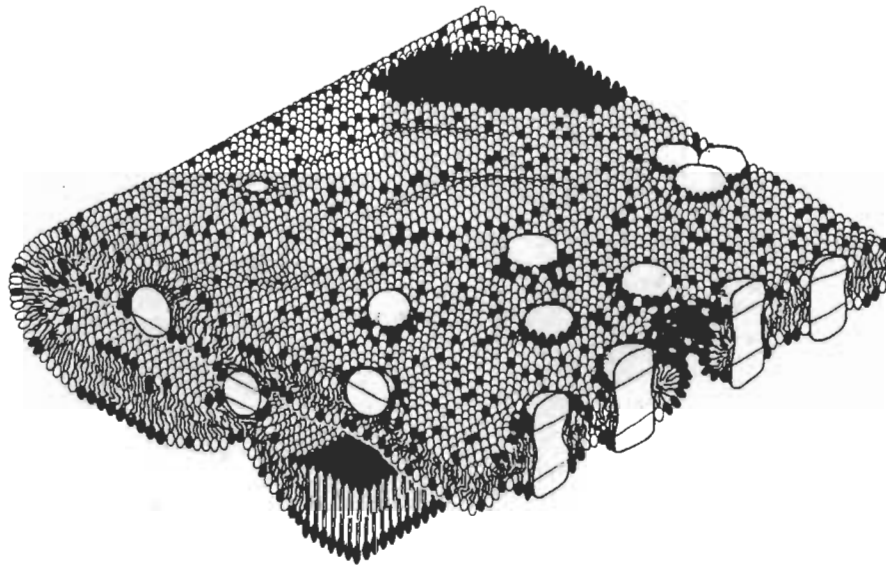


Fig. 4. Schematic illustration of a biological membrane in which the membrane proteins and lipids pack together in accordance with thermodynamic and packing constraints. Clustering of specific lipids may occur near proteins as well as at highly curved regions of a membrane. Such curved regions could act as diffusion barriers to those lipids and proteins not able by packing to negotiate around these regions.

Figure 1.2. – Illustration d'une membrane biologique. Modèle plus élaboré que celui de Singer & Nicolson. (Tiré de Israëlachvili, 1978)

Ce mécanisme membranaire et tous ceux de nature vectorielle (c'est-à-dire la plupart) nous amènent à postuler l'existence d'une asymétrie au niveau de la membrane biologique. Des études plus directes par microscopie électronique montrent une asymétrie marquée du profil de densité électronique au niveau de la membrane. Un exemple bien net est celui de la membrane cytoplasmique de la bactérie *Bacillus subtilis* (Silva, 1983). L'avènement de la technique de cryodécapage a permis littéralement d'ouvrir les deux feuillets membranaires et de mettre ainsi en évidence des différences d'aspect de chacune des faces intérieures du feuillet membranaire. Il n'en fallut pas davantage à Singer & Nicolson (1972) et à Bretscher (1972) pour mettre de l'avant l'idée d'une asymétrie transversale de la membrane.

Notons tout de suite que chaque moitié du feuillet bilipidique conserve - bien qu'ayant des interactions avec l'autre moitié qui lui fait face - une relative indépendance, et par conséquent des propriétés qui lui sont propres. La terminologie anglo-saxonne rend assez bien l'idée par le terme «bilayer couples» (Singer, 1974, Sheetz & Singer, 1974).

1.2.1 Asymétrie des constituants membranaires

La membrane de l'érythrocyte fut la première dont on a pu établir clairement l'asymétrie (Casu & coll., 1968; Bretscher, 1972). Cela s'explique principalement par le fait que l'on peut manipuler facilement la membrane du globule rouge et faire en sorte qu'elle adopte différentes configurations. Nous avons ainsi une membrane pour laquelle nous avons accès, selon les configurations, au feuillet interne ou externe. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour mesurer l'asymétrie membranaire (Houslay & Stanley, 1982). Ainsi, la détermination de la distribution transversale des protéines et lipides membranaires peut s'effectuer à l'aide de marqueurs chimiques, d'anticorps, de lectines, de lipases et de protéases, de protéines échangeuses de phospholipides, ou encore par spectroscopie RMN et RPE, par diffraction aux neutrons, etc. (Pour une revue générale sur la problématique de l'asymétrie membranaire, nous conseillons l'article de revue d'Etemadi, 1980).

De ces études sur la membrane érythrocytaire et sur d'autres membranes, il ressort que l'asymétrie de distribution des protéines est totale: les protéines extrinsèques, ou qui ne sont que partiellement enfouies dans la bicouche lipidique, sont localisées sur une des deux faces, et celles qui traversent la membrane de part en part, les protéines intégrales, ont une orientation bien définie par rapport au plan membranaire. D'ailleurs, s'il en était autrement,

les protéines ne pourraient assurer certaines fonctions mentionnées antérieurement (des fonctions à caractère vectoriel, tel le pompage de protons par exemple). L'asymétrie des glycolipides et des glycoprotéines est elle aussi totale, les résidus sucrés se retrouvant exclusivement du côté opposé au feuillet cytoplasmique, qu'il s'agisse de la membrane plasmique ou de celle des organites intracellulaires.

Quant aux lipides, ils sont eux aussi distribués asymétriquement mais non de manière absolue. Les lipides ont leur côté préféré pourrions-nous dire! Ainsi si l'on considère la membrane érythrocytaire, nous retrouvons les phospholipides phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS) préférentiellement du côté cytoplasmique et les phospholipides phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SM) préférentiellement du côté extracellulaire (Verkleij & coll, 1973). Chez les plaquettes sanguines, seule la sphingomyéline se retrouve préférentiellement du côté extérieur alors que la PC, la PE et la PS, se retrouvent majoritairement dans le feuillet interne (Zwaal & Bevers, 1983). Le même patron d'asymétrie se retrouve chez les membranes rénales dites de bordure en brosse (Vénien & Le Grimmelec, 1987). Il est à noter que chacune des membranes que nous avons jusqu'à maintenant étudiées montre une asymétrie qui lui est propre. D'en découvrir un jour une qui serait symétrique apparaît de plus en plus illusoire. Nous retrouvons au tableau 1, une liste des principales membranes des cellules eucaryotes dont nous avons pu mettre clairement en évidence une asymétrie lipidique (pour une revue concernant l'asymétrie des membranes virales et bactériennes, voir Op den Kamp, 1979).

Tableau 1
 Patron d'asymétrie lipidique de quelques membranes plasmiques et intracellulaires

Membrane	Côté Extracytoplasmique	Côté Cytoplasmique	Référence
<i>M. plasmiques</i>			
Erythrocyte (homme)	PC, SM	PE, PS	Verkleij & coll., 1973.
Plaquette (homme)	SM	PE, PS, PI	Perret & coll., 1979.
Hépatocyte (rat)	PC, SM, PE	PS, PI	Higgins & Evans, 1978.
Bordures en brosse (lapin)	SM	PE, PC, PS, PI	Vénien & coll., 1988.
Spermatozoïde (bélier)	PC, SM, PE	DPG, PG, PS, PI	Hinkovska & coll., 1986.
Sarcolemme cardiaque (rat)	SM	PC, PE, PS, PI	Post & coll., 1988.
<i>M. intracellulaires</i>			
Réticulum endoplasmique*	SM, PI	PE, PS	De Pierre & Ernster, 1977.
Dictyosome*	SM, PI	PC, PE, PS	De Pierre & Ernster, 1977.
Mitochondrie - membrane interne*	DPG, PI	PC, PE	De Pierre & Ernster, 1977.
Lysosome*	SM, PI	PC, PE	De Pierre & Ernster, 1977.
RS squelettique (lapin)	PS, SM, PI	PE	Herbette & coll., 1984.
Synaptosome (raie électrique)	PS	PC, PE, PI	Michaelson & coll., 1983.
Disque des bâtonnets (boeuf)	PC	PE, PS	Miljanich & coll., 1981.

Les membranes affectées d'un astérisque font référence à l'hépatocyte de rat. Seuls les phospholipides ayant une distribution asymétrique marquée apparaissent dans ce tableau. Les symboles des différents phospholipides apparaissent au début du travail.

Outre le fait que l'asymétrie phospholipidique soit générale, certains traits semblent se dégager. Premièrement les aminophospholipides semblent se retrouver de manière privilégiée sur le côté cytoplasmique alors que les cholinophospholipides (surtout la sphingomyéline) préfèrent la face opposée. Deuxièmement, les lipides chargés négativement (PS, PI, PG, DPG) se retrouvent quasi exclusivement sur la face cytoplasmique sauf le PI et le DPG qui peuvent se retrouver aussi du côté de la lumière de certains organites intracellulaires.

L'asymétrie lipidique n'en demeure pas moins variable. Elle dépend du type de membrane, du type de cellule, de l'organisme étudié aussi. Mais pourquoi cette asymétrie particulière ? Peut-on faire un lien entre une asymétrie lipidique particulière et les fonctions particulières d'une membrane ? Peut-on corréler l'asymétrie lipidique à l'asymétrie protéique ?

L'asymétrie lipidique peut soit affecter de manière spécifique l'action des protéines, soit affecter l'activité des protéines par le biais de propriétés plus globales de la membrane (viscosité, tension de surface, densité superficielle de charges, etc.) ou plus vraisemblablement via une synergie positive de ces deux types de mécanismes. Dans le premier cas, nous touchons le vaste domaine des interactions lipides-protéines alors que dans le second, il est question de la modulation lipidique des protéines, quoique certains auteurs (Deuticke & Haest, 1987) utilisent ce terme générique ou celui de régulation lipidique pour désigner l'ensemble des deux phénomènes.

Signalons que depuis plusieurs années de nombreuses études de reconstitution membranaire ont démontré que des enzymes, telles la cytochrome c oxydase (Vik & coll., 1981), la β -hydroxybutyrate déshydrogénase (Fleisher & coll., 1983) et la signal peptidase pancréatique (Jackson & White, 1981), requièrent pour leur fonctionnement optimal la présence de tel ou tel lipide ou plus précisément de tel ou tel mélange de lipides. Ce mélange correspond-il à ce que l'on retrouve naturellement chez la membrane native ? Pourquoi encore retrouve-t-on chez la membrane native cet arrangement lipidique particulier ? Ces questions sont ardues. Les premiers résultats des expériences de substitution lipidique ne nous permettent pas de répondre à de telles questions concernant la "régulation lipidique". Elles ont déjà toutefois la qualité d'en montrer la finesse (voir Wrigglesworth, 1984).

1.2.2 Asymétrie des propriétés physicochimiques

L'asymétrie lipidique entraîne généralement une asymétrie de charges des deux côtés de la membrane: certains lipides étant globalement neutres à pH physiologique (PC, SM, PE), d'autres portant une seule charge électrique nette négative au niveau de leur partie polaire (PS, PG, PI) ou encore deux charges (DPG). Ainsi l'asymétrie lipidique de la membrane de l'érythrocyte est telle que nous y retrouvons au moins vingt fois plus de lipides chargés négativement du côté cytoplasmique que du côté extracellulaire; pour la membrane discale des bâtonnets réiniens bovins, le rapport est de 5 en faveur du côté cytoplasmique et pour la membrane plasmique du spermatozoïde de bœuf, il est de 4. Ce rapport semble déterminant pour le bon fonctionnement de la membrane. Hubbard & Brody, en 1975, ont démontré chez des mutants auxotrophes de *Neurospora crassa* que ce rapport demeure constant sur les deux faces de la membrane, même si la composition lipidique des

membranes des différents mutants varie de manière significative. Nous reviendrons plus loin sur les conséquences de cette asymétrie de charges.

Asymétrie lipidique implique aussi - à moins d'un heureux (?) hasard - asymétrie de viscosité. Cette asymétrie de viscosité fut mise en relief au milieu des années '80. Des études par les techniques FRAP (Morrot & coll., 1986) et par spectroscopie RPE (Seigneuret & coll., 1984) de la membrane érythrocytaire montrent une fluidité plus grande du feuillet monomoléculaire interne relativement au feuillet externe; en conformité donc avec le fait que les lipides du feuillet cytoplasmique possède un plus fort degré d'insaturation que ceux composant le feuillet externe. Une asymétrie de fluidité fut également observée chez la membrane plasmique synaptique de neurones de cerveau de souris à l'aide de la technique de fluorescence polarisée (Schroeder & coll., 1988). Cette fois, c'est le feuillet externe qui fut trouvé le plus fluide. Cette viscosité "différentielle" permettrait-elle, comme le prétendaient déjà Bergelson et Barsukov, en 1977, un contrôle "différentiel" des activités enzymatiques localisées sur chacune des monocouches ?... Wood & coll. (1989) viennent à tout le moins de mettre en évidence que l'éthanol affecte différemment chacun des feuillets de la membrane neuronale chez la souris.

Une asymétrie lipidique pourrait aussi causer une pression latérale différente au sein de chacune des monocouches (et une compressibilité différente aussi !). Ces différences de pression peuvent-elles conduire à des changements structuraux des lipides et des protéines ? Nous n'en savons rien; d'ailleurs, l'existence même de cette asymétrie de pression latérale demeure spéculative (Bretscher, 1985).

Ces asymétries "globales" ne devraient pas nous faire perdre de vue que les membranes biologiques ne sont pas homogènes latéralement. Nous devons les voir comme composées de deux séries de domaines différents se déplaçant les uns par rapport aux autres et interagissant, se couplant verticalement à certains endroits. Ce couplage pourrait devenir important dans les régions de la membrane montrant un fort degré de courbure (bordures des disques ou des thylakoïdes par exemple). Ces nouvelles (?) conceptions de la membrane ont permis à certains auteurs (Müller & Krueger, 1986; Shinitzky, 1987) d'expliquer, via un changement de fluidité d'un des feuillets, le déplacement vertical de plusieurs protéines-récepteurs.

1.2.3 Importance de l'asymétrie lipidique en biologie

L'importance de l'asymétrie sur les fonctions membranaires peut être abordée en examinant les conséquences pathologiques d'une altération exogène de l'asymétrie lipidique ou encore en comparant les distributions lipidiques entre membranes de cellules saines ou atteintes de maladies. Ici, encore, la majorité des travaux fut effectuée sur la membrane érythrocytaire.

Une des pathologies du sang les mieux caractérisées demeure sans nul doute l'anémie falciforme. Les membranes de globules rouges adoptant la forme caractéristique de la maladie montrent une redistribution des phospholipides. La PE et la PS se retrouvent en plus grande quantité du côté extracellulaire alors que la PC se déplace vers le côté interne (Lubin & coll., 1981). Par ailleurs, Maguire & coll. (1991) ont noté une augmentation significative du pourcentage d'aminophospholipides (PE, PS) sur le feuillet externe de la membrane du globule rouge suite à l'infection de ces cellules par un parasite causant la malaria. McEvoy & coll. en 1986 ont montré, quant à eux, que la destruction de l'asymétrie lipidique de la membrane du globule rouge entraînait une phagocytose des globules rouges quatre fois plus élevée que la normale. L'apparition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane serait perçue par les macrophages comme un signe de la sénescence du globule rouge. Dans le même ordre d'idées, Schroeder (1984) développa l'idée générale que le vieillissement du tissu nerveux serait dû à une perte progressive de l'asymétrie lipidique, perte causée à l'origine par une peroxydation des phospholipides situés sur la face interne de la membrane.

Signalons en terminant que certains phénomènes non pathologiques telle l'agrégation plaquettaire s'accompagnent d'une redistribution importante des phospholipides sur chacun des feuillets de la membrane. Dans ce cas précis, il fut élucidé en quoi cette redistribution lipidique favorise le mécanisme global (Zwaal & Bevers, 1983).

1.2.3.1 Importance de l'asymétrie électrostatique d'origine lipidique

Nous avons vu à la section 1.2.2 que l'asymétrie lipidique se révélait multiforme. Nous nous intéresserons ici à un aspect particulier, l'aspect électrostatique de l'asymétrie lipidique. Tel que mentionné ci-dessus, une asymétrie lipidique implique généralement une asymétrie de charges, laquelle implique, nous le verrons plus en détail au chapitre 2, l'existence d'un champ électrique transmembranaire. Ainsi toute charge quelle qu'elle soit

sentira la présence de ce champ électrique et acquerra un potentiel donné, dépendamment de sa position dans ce champ. Mais tout champ électrique ne provient pas nécessairement de la présence de charges électriques nettes. En fait, une distribution quelconque de charges (dipôles, quadrupôles, etc.) crée un champ électrique. Aussi est-il important de souligner que toute asymétrie phospholipidique (les phospholipides fussent-ils neutres), implique nécessairement une asymétrie du champ électrostatique, et ce, pour la bonne raison que les phospholipides zwitterioniques (globalement neutres) PE, PC et SM ne sont pas identiques "électrostatiquement", pas plus que ne le sont les phospholipides anioniques (portant une charge négative) PS, PI et PG.

Quelle est la portée du potentiel électrostatique à la surface de la membrane ? Quelle est sa grandeur ? Joue-t-il un rôle sur les interactions membrane-protéine extrinsèque ? sur les interactions récepteur-hormone ? sur les interactions membrane-membrane ? La membrane peut-elle être vue comme un dipôle ? Ce dipôle affecte-t-il les différents processus se produisant au voisinage de la membrane ? Quelle est la grandeur du champ électrique transmembranaire causé par les charges nettes à la surface de la membrane ? de celui causé par les dipôles ? Quel est le champ net résultant ? Autant de questions auxquelles nous tenterons de répondre au chapitre 2.

Pour l'instant, contentons-nous d'affirmer que les potentiels membranaires régissent bon nombre de processus biologiques, que le champ électrostatique membranaire affecte les interactions membrane-membrane, membrane-protéine extrinsèque, protéine intrinsèque-protéine extrinsèque, récepteur-hormone, enzyme-substrat, etc. En fait tout phénomène se produisant aux abords de la membrane (et où au moins un des constituants est, soit chargé, soit dipolaire) est susceptible d'être affecté. De nombreuses revues de la littérature sont consacrées aux potentiels membranaires et à leur importance en biologie. Mentionnons celles de McLaughlin (1977), de Barber (1980), d'Ohki (1985), de Wojtczak & Nalecz (1985), de Mc Laughlin (1989) et celle de Cevc (1990).

Si l'on s'intéresse plus spécifiquement à l'influence du champ électrique transmembranaire (lequel est directement relié à l'asymétrie membranaire), l'on retrouve encore un grand nombre de phénomènes où celui-ci intervient (pour une revue voir Clementz & coll., 1988). Citons: i) l'insertion des protéines membranaires lors de leur biosynthèse (Weinstein & coll., 1982), ii) les changements d'orientation ou, plus généralement, de conformations de

ces protéines (couplage électroconformationnel), iii) l'assemblage d'unités protéiques en une structure fonctionnelle, iv) la translocation de l'ADN lors d'une infection virale (Grinius, 1980), v) la pinocytose et vi) le mouvement amiboïde (Dolowy, 1987). De manière succincte, nous donnerons un exemple pour les trois premiers cas.

La première protéine où il a été montré que le champ électrique transmembranaire constituait une condition sine qua non à son insertion dans une membrane fut la protéine du manteau du bactériophage M13 (Date & coll., 1980). Dans une première étape, le précurseur de la protéine se fixe électrostatiquement sur la face interne de la membrane plasmique de son hôte *E. coli*. Le précurseur s'insère ensuite dans la membrane et, lorsque l'insertion est complète, une peptidase, sur la face périplasmique, coupe la séquence-signal. En abolissant la différence de potentiel transmembranaire à l'aide d'agents découplants, les auteurs ont observé que le précurseur restait confiné sur la face cytoplasmique. Un schéma du mécanisme est donné à la **figure 1.3**.

Parmi les exemples de protéines changeant de conformation en présence d'un champ électrique transmembranaire, le cas des protéines-canaux voltage-dépendant occupent une place de choix. Les travaux d'Hodgkin & Huxley, modélisant mathématiquement cette dépendance, leur ont valu un prix Nobel, mais ce n'est qu'à partir des années '80 que l'on a pu se faire une idée précise du mécanisme régissant l'ouverture et la fermeture de ces protéines-canaux. Armstrong, en 1981, avança le premier l'idée que le couplage avec le champ électrique pouvait s'effectuer par la rotation d'une hélice transmembranaire. Une fois la séquence primaire de la protéine déterminée, Catterall & coll. en 1986, proposèrent un modèle plus précis: la dépolarisation de la membrane force une rotation de 60° de l'hélice S4 du canal sodique et entraîne ainsi le déplacement d'une charge au travers de la membrane (leur modèle est présenté à la **figure 1.4**). Compte tenu de la disposition et du nombre des hélices transmembranaires de la protéine, ce résultat est en accord avec les prédictions théoriques d'Hodgkin & Huxley. Il est important de souligner ici que, si l'on perturbe le champ transmembranaire, soit en modifiant les concentrations ioniques, ou encore par l'ajout de molécules possédant un moment dipolaire, l'activité du canal sera modifiée.

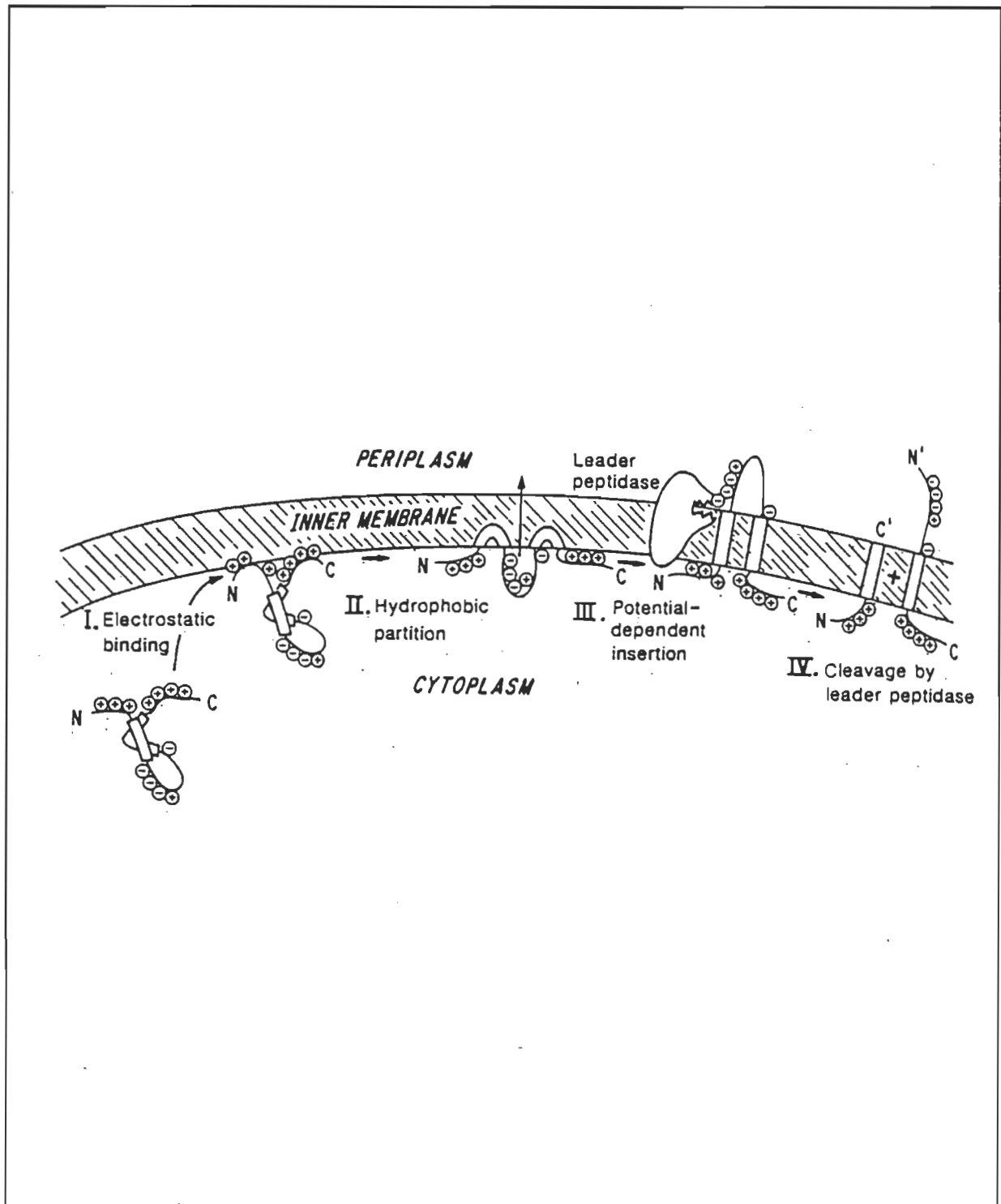


Figure 1.3. – Insertion voltage-dépendant de la protéine M13 de *E. coli*. (Tiré de Kuhn & coll., 1986).

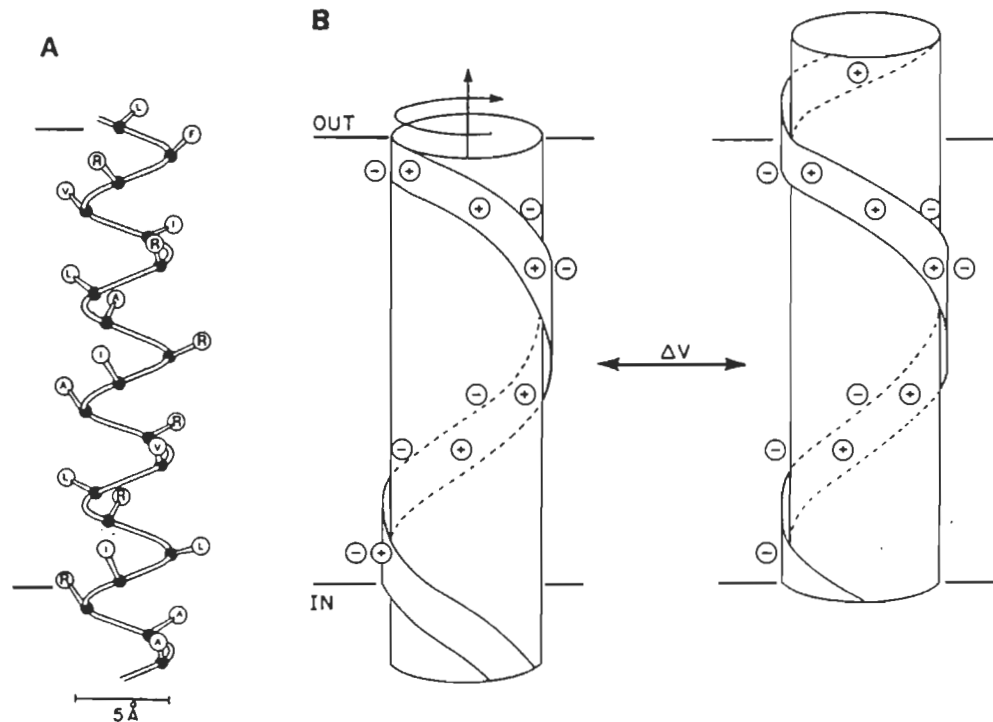


FIGURE 7. A sliding helix model of voltage-dependent gating. (A) A ball-and-stick, three-dimensional representation of the S4 helix of domain IV. Darkened circles represent the α -carbon of each amino acid residue. Open circles show the direction of projection of the side chain of each residue away from the core of the helix. Nonpolar residues are illustrated in thin letters by their single letter code: F, Phe; A, Ala; I, Ileu; L, Leu; V, Val. Positively charged amino acids are illustrated in bold letters: R, Arg. (B) The spiral path made by the positively charged arginine residues is illustrated in the form of a ribbon wrapped around the central core of the helix. Right, Movement of the S4 helix in response to membrane depolarization. The proposed transmembrane S4 helix is illustrated as a cylinder with a spiral ribbon of positive charge. At the resting membrane potential (*left*), all positively charged residues are paired with fixed negative charges on other transmembrane segments of the channel and the transmembrane segment is held in that position by the negative internal membrane potential. Depolarization reduces the force holding the positive charges in their inward position. The S4 helix is then proposed to undergo spiral motion through a rotation of approximately 60° and an outward displacement of approximately 5 Å. This movement leaves an unpaired negative charge on the inward surface of the membrane and reveals an unpaired positive charge on the outward surface to give a net charge transfer of +1.

Figure 1.4. – Mécanisme présidant à l'ouverture du canal sodique. Modèle du glissement voltage-dépendant de l'hélice S4. (Tiré de Catterall & coll., 1986).

Le troisième exemple concerne un antibiotique, l'alaméthicine. Cet antibiotique de 19 acides aminés est connu pour former des canaux dont l'ouverture dépend de la tension. De nombreuses études, à l'aide de membranes artificielles, ont démontré que la molécule d'alaméthicine (qui ne porte aucune charge nette) se comporte comme un dipôle. Les monomères d'alaméthicine s'adsorbent parallèlement à la membrane et, suite à l'imposition d'un potentiel transmembranaire, s'orientent au travers de la membrane. Une fois orientés, les monomères s'agrègent suite à la diffusion latérale et forment des canaux dans la membrane. Le schéma de la **figure 1.5** illustre ce processus.

Ces exemples illustrent le fait que l'on connaît de mieux en mieux les mécanismes par lesquels le champ électrostatique transmembranaire agit sur le fonctionnement de la membrane. Mais cela n'est pas une finalité en soi; il faudrait aussi mesurer, caractériser le champ électrique transmembranaire de la membrane native et le corrélérer avec l'asymétrie de cette même membrane. Alors pourrions-nous comprendre pourquoi une membrane montre telle ou telle asymétrie.

La présente étude vise justement à corrélérer asymétrie lipidique et potentiel transmembranaire. Trois remarques limitatives s'imposent toutefois: premièrement, l'asymétrie membranaire est à la fois lipidique et protéique (les protéines aussi portent des charges) et il n'est pas facile de discriminer les deux contributions... et leurs interdépendances ! ¹ Deuxièmement, il ne faudrait pas s'étonner si la membrane native possède une asymétrie qui n'est pas celle optimale, électrostatiquement parlant. L'asymétrie de fluidité peut se révéler de première importance aussi et la membrane biologique, si elle était dotée d'un organe pensant, devrait déterminer un nouvel optimum. Enfin, comme dit précédemment, l'existence de domaines compliquent encore plus le topo. Non seulement, faut-il préciser à quel endroit l'on se trouve sur la membrane mais encore, en toute rigueur, faudrait-il de plus tenir compte des gradients latéraux !

¹ À ce propos, les récents travaux de W. L. Hubbell sur la membrane discale (Tsui & coll., 1990; Hubbell, 1990) ouvrent définitivement la marche.

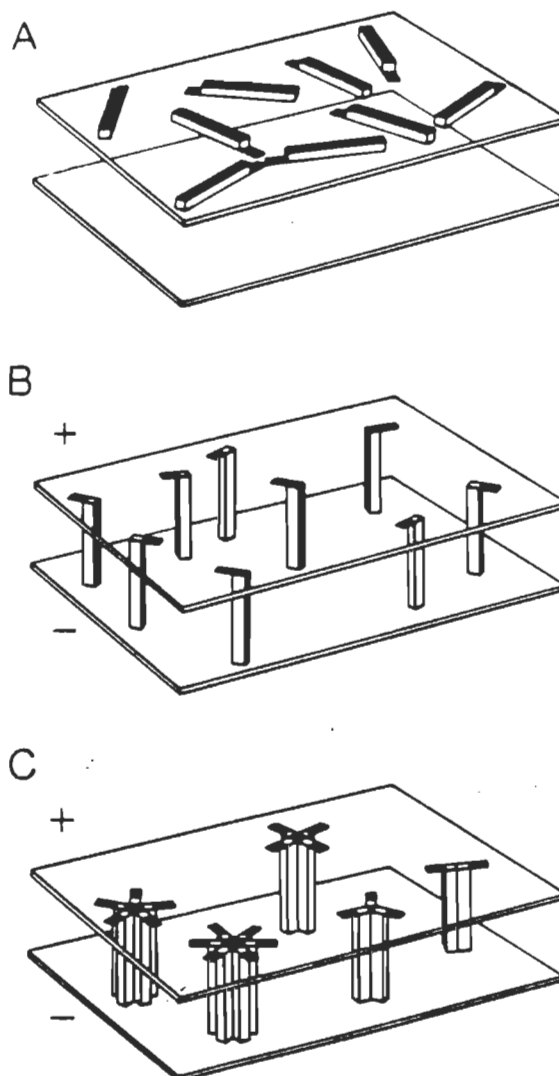


Fig. 10: Un modèle du processus d'excitation de l'alaméthicine. A: au repos, les molécules d'alaméthicine sont à la surface membranaire et parallèles à celle-ci. L'extension à l'extrémité de la molécule représente le résidu glutamique, l'ion est fixé à l'extrémité opposée. B: Sous l'effet du champ électrique sur l'ion, les molécules s'orientent perpendiculairement à la membrane. C: la diffusion latérale à l'intérieur de la membrane conduit à l'agrégation des monomères en oligomères. Tiré de Baumann et Mueller, *Journal of Supramolecular Structure*, 2, 1974, Fig. 2.

Figure 1.5. – Modèle dit «barrel stave» du processus d'excitation de l'alaméthicine. Selon ce modèle, l'insertion des monomères dans la bicouche constituerait l'étape voltage-dépendant du processus. (Tiré de Laprade, 1977)

1.3 Choix de la technique de reconstitution membranaire

Corréler asymétrie lipidique et potentiel transmembranaire *in vivo* est une lourde tâche, la membrane biologique étant très complexe. Heureusement, nous pouvons compter sur des membranes modèles plus simples et dont nous pouvons contrôler certains paramètres, comme leur composition par exemple. De plus, ces structures s'apparentent bien, au niveau de leurs propriétés physicochimiques, à la membrane native. L'utilisation de membranes artificielles constitue donc une étape préliminaire de bon aloi dans les circonstances.

Des différentes membranes modèles à l'heure actuelle, nous distinguons les films monomoléculaires à l'interface air-eau ou huile-eau (technique des monocouches), les films mono-et multimoléculaires sur substrat solide (technique de Langmuir-Blodgett), les films bilipidiques plans (technique des films noirs et de Montal-Mueller) et les liposomes (vésicules uni- et plurilamellaires)². Pour une courte et concise revue sur ces membranes modèles, signalons les articles de Coronado & Labarca, 1984, et de Gliozzi & Robello, 1989 et la monographie de Jones, 1975. Pour une revue plus approfondie, voir Cadenhead, 1985 et Möhwald, 1990 (films monomoléculaires); Roberts, 1984 (technique Langmuir-Blodgett); Fettiplace & coll., 1975 (films noirs); Lasic, 1989 et Ostro, 1987 (liposomes).

La technique des films monomoléculaires la plus courante est celle qui consiste à étaler à l'interface air-eau un lipide ou une protéine amphiphile (ou encore un mélange d'amphiphiles) préalablement dissous dans un solvant volatil. La présence de molécules amphiphiles à l'interface amène une baisse de la tension de surface et cette diminution est communément appelée pression de surface. En déposant un nombre donné de molécules tensioactives à l'interface et en diminuant l'aire disponible pour ces molécules, l'on peut mesurer les variations de la pression de surface avec l'aire moléculaire moyenne. L'ensemble de ces points constitue une isotherme de pression de surface. Le même procédé, mais cette fois en mesurant le potentiel à l'interface air-eau, nous fournit une seconde courbe: l'isotherme de potentiel de surface. De ces courbes, différentes informations concernant les dimensions géométriques et le moment dipolaire des molécules

² Nous excluons ici les membranes de polymères synthétiques, généralement épaisses, qui sont couramment utilisées en industrie pour séparer certains constituants.

peuvent être tirées. De plus, si l'on dépose un mélange de molécules ou si l'on injecte différents produits dans la phase aqueuse, l'on peut quantifier la nature et la grandeur des interactions entre les molécules à l'étude.

Le grand avantage de la technique - et ce qui la distingue de toutes les autres - réside dans la possibilité de varier l'aire moléculaire ou, si l'on veut, d'étudier un lipide ou un mélange lipides-protéines à différentes pressions de surface. Par contre le fait de n'avoir qu'une interface air-eau (ou une seule interface eau-huile) fait du film monomoléculaire une pâle image de la membrane biologique. Cela est particulièrement patent, si l'on veut corréler asymétrie lipidique, potentiel transmembranaire et transport ionique. D'aucuns pourront objecter que l'on peut mimer séquentiellement chacune des interfaces et tirer des conclusions du même ordre, mais cela revient à ignorer complètement l'influence réciproque des deux feuillets lipidiques des membranes biologiques.

Ces mêmes réserves se posent a fortiori pour les films monomoléculaires sur substrat solide. Cette technique ouvre toutefois la possibilité, en trempant à plusieurs reprises le support solide (en général une lame de verre silanisée) au travers d'un film monomoléculaire comprimé à une pression donnée, de déposer sur le support plusieurs films monomoléculaires s'organisant en bicouches ou en multi-bicouches. Une étude exceptionnelle (Merkel, Sackmann & Evans, 1989) utilisant des bicouches déposées sur substrat solide a permis de mettre en évidence un couplage entre domaines des feuillets adjacents. Les auteurs ont même démontré qu'une transition de phase, où coexistent domaines fluides et cristallins sur un feuillet de PC, induisait l'apparition, aux mêmes positions, des mêmes domaines fluides et cristallins sur le feuillet de PE adjacent («epitactic coupling»). La technique de Langmuir-Blodgett semble offrir ici un modèle de choix pour l'étude des membranes biologiques. Par contre, l'infime petitesse des phases aqueuses bordant la bicouche et leur non-accessibilité ne permettent aucunement d'étudier sérieusement les effets d'une asymétrie lipidique sur l'activité de protéines intrinsèques, par exemple.

Les liposomes sont des structures lipidiques closes contenant un volume d'eau au centre. Les vésicules multilamellaires (MLV) sont composées de plusieurs bicouches concentriques séparées les unes des autres par des couches d'eau alors que les vésicules unilamellaires sont constituées, comme leur nom l'indique, par une seule bicouche se

refermant sur elle-même. Les vésicules unilamellaires se distinguent par leur taille: les petites vésicules unilamellaires ou SUV (diamètre inférieur à 100 nm), les grandes ou LUV (diamètre inférieur à 1 μ m) et les géantes ou GUV (diamètre supérieur à 1 μ m). La technique des liposomes est une des plus simples à mettre en oeuvre. Pour les MLV, il s'agit simplement de disperser des lipides amphiphiles dans un volume d'eau suffisant. Pour les vésicules unilamellaires, deux techniques sont couramment utilisées: l'on peut soit traiter les MLV aux ultrasons, soit encore injecter une solution de lipides à l'éthanol sous pression. Pour les vésicules de plus grande taille, une myriade de techniques ont été développées avec les années. Le lecteur curieux pourrait consulter les revues de Szoka & Papahadjopoulos, 1980 et de Woodle & Papahadjopoulos, 1987).

Outre le fait qu'ici nous retrouvons bien la structure à mimer (feuillet bilipidique limité par deux phases aqueuses), ces membranes modèles se distinguent par leur grande facilité de formation, leur stabilité, leur grand rapport surface/volume et leur possibilité d'encapsuler drogues ou médicaments. Par contre, leur structure fermée rend le compartiment intérieur peu accessible (constituant un handicap insurmontable pour qui s'intéresse, par exemple, au transport ionique) et leur mode de formation spontané ne permet aucun contrôle de l'asymétrie membranaire. Si l'on veut mimer le mieux possible le système biologique (la membrane biologique est asymétrique et les milieux la bordant aussi !), il faut chercher ailleurs. Notons toutefois que c'est à l'aide de bicouches de ce type qu'il a été possible de mettre en évidence, pour la première fois, le couplage entre les feuillets lipidiques. Le terme interdigitation des chaînes fait maintenant partie du vocabulaire.

Les films bilipidiques plans se divisent en deux catégories: les films noirs et les films Montal-Mueller. Les films bilipidiques noirs ou BLM («Black Lipid Membranes») tirent leur nom de leur apparence sous lumière blanche. Pour les fabriquer, on perce un orifice lisse et circulaire au travers d'une partition hydrophobe séparant deux compartiments. L'orifice est ensuite enduit d'un solvant hydrocarboné. L'on remplit ensuite les deux compartiments de solution aqueuse au-dessus de l'orifice. L'expérimentateur badigeonne alors l'orifice, à l'aide d'un pinceau ou d'un autre instrument, d'une certaine quantité d'une solution de lipide. Spontanément, l'excès de solvant (décane, hexadécane ou autre solvant organique) est drainé vers la périphérie et la "membrane" s'amincit. L'on peut suivre le phénomène en éclairant l'orifice. La membrane passe, selon son épaisseur, du gris, à des couleurs d'interférence, jusqu'à devenir noire. A ce stade, la membrane fait certainement

moins de 50 nm d'épaisseur et différentes mesures montrent qu'elle devient alors bilipidique.

Contrairement aux liposomes, les films noirs permettent un accès direct aux deux compartiments aqueux. Étant donné aussi leur petit rapport surface/volume, les films noirs se révèlent des outils de choix pour l'étude du transport ionique. Les films noirs ont, par contre, le désavantage de contenir du solvant. En fait, ce désavantage peut être amoindri voire pratiquement éliminé par l'utilisation d'alcane à longues chaînes, ou encore en variant la température (White, 1978). Mais vu la facilité de former des bicouches avec un solvant à petite chaîne comme le décane - et semble-t-il la difficulté de se défaire de certaines habitudes - le bât blesse toujours. Il est étonnant de constater que la majorité des chercheurs reconstituant des protéines-canaux à l'aide de cette technique utilisent encore aujourd'hui du décane (Cukierman & coll., 1988; Lukacs & Moczydlowski, 1991) alors que l'on sait depuis longtemps que ces bicouches peuvent contenir en leur sein des quantités appréciables de ce solvant organique. Elliott & coll. (1985) estiment que l'épaisseur des bicouches de GMO et de DOPC passe de 2,6 nm lorsque le squalène est utilisé comme solvant à 4,8 nm lorsqu'il s'agit du décane. Une augmentation d'épaisseur de presque un facteur deux ! ³ Perin & MacDonald (1989), par microphotographie de fluorescence, ont visualisé, quant à eux, des microlentilles (probablement de solvant) dans des bicouches au décane. Hormis la présence possible, et parfois certaine, de solvant organique dans la bicouche, la technique souffre de deux limitations majeures: premièrement, l'existence d'une zone périphérique entre la partie bilipidique et la partition hydrophobe («torus», «Plateau-Gibbs border») de grande dimension (visible à l'oeil nu) susceptible d'affecter les différentes propriétés de la bicouche (White, 1986) et deuxièmement, l'impossibilité de former des bicouches asymétriques, ce qui limite singulièrement l'étude des potentiels transmembranaires intrinsèques à la nature de la membrane.

La technique mise de l'avant par Mauricio Montal et Paul Mueller, en 1972, consiste en l'adjonction de deux films lipidiques au niveau d'un petit orifice percé au travers d'une partition hydrophobe (généralement en téflon) séparant deux compartiments aqueux. Deux étapes préalables: badigeonner le pourtour de l'orifice d'un enduit hydrocarboné et étaler un

³ Un tableau de la fraction volumique de solvant dans le film noir se retrouve dans Gliozzi (1980) et Fettiplace & coll (1975).

film lipidique à la surface de chacun des bassins. Cette dernière étape s'effectue de la même manière que pour la technique des films monomoléculaires, à la différence près que l'on dépose ici un excès de lipides à l'interface air-eau ⁴. L'adjonction de ces films s'effectue, soit en abaissant la partition entre les deux compartiments aqueux (Montal & Mueller, 1972), soit en élevant alternativement (voir **figure 1.6**) les niveaux d'eau de chaque côté de l'orifice (Montal, 1974), soit encore en tournant la paroi hydrophobe de manière à plonger une ouverture ovoïde entre les deux compartiments (Dambacher & Fromherz, 1986). La technique de Montal-Mueller permet, comme pour les BLM, un contrôle aisé de la température, du pH et de la composition ionique de chacun des compartiments aqueux adjacents à la membrane mais le grand avantage de la technique réside en la possibilité de former des bicouches asymétriques. Les bicouches planes formées par cette technique seront ainsi asymétriques si on dépose à l'interface, de part et d'autre de la partition, des films lipidiques (ou lipoprotéiques) de composition différente. La technique de Montal-Mueller se distingue favorablement de celle des BLM par les points suivants: i) possibilité de former des bicouches asymétriques, ii) très peu de solvant piégé dans la partie bilipidique («quasi solvent-free bilayers»), iii) zone périphérique de petites dimensions (influence moins grande de celle-ci sur la bicouche et plus grande facilité à mesurer la surface proprement bilipidique) et iv) meilleur contrôle de la composition lipidique.

La technique Montal-Mueller fut longtemps la seule à permettre la formation de membranes asymétriques, mais en juin 1982, une nouvelle technique dite du «tip-dip» fit son apparition (Wilmsen & coll., 1983). Des bicouches asymétriques sont ici formées en immergeant successivement l'extrémité d'une micropipette de verre - en tout point semblable à celle utilisée en 1976 par Neher & Sakmann - au travers de deux films lipidiques à l'interface air-eau de composition différente. Cette technique rejoint donc, en essence, celle de Montal-Mueller. Elle permet de plus, vu la petitesse de la membrane formée, des mesures électriques beaucoup plus fines. Elle n'exige aussi que d'infimes quantités de matériel biologique. Mais - revers de la médaille -, cette nouvelle technique n'est pas de tout repos et seuls quelques laboratoires sur la planète maîtrisent cette technique (Coronado & Latorre, 1983; Hamamoto & Montal, 1986; Rojas & Pollard, 1987).

⁴ Des expériences menées au laboratoire ont démontré que nous ne pouvons former des bicouches à partir de films strictement monomoléculaires (Tancrède & coll., 1983). Malheureusement, l'on retrouve encore dans la littérature l'appellation «bicouches formées à partir de monocouches» («bilayer made from monolayers»).

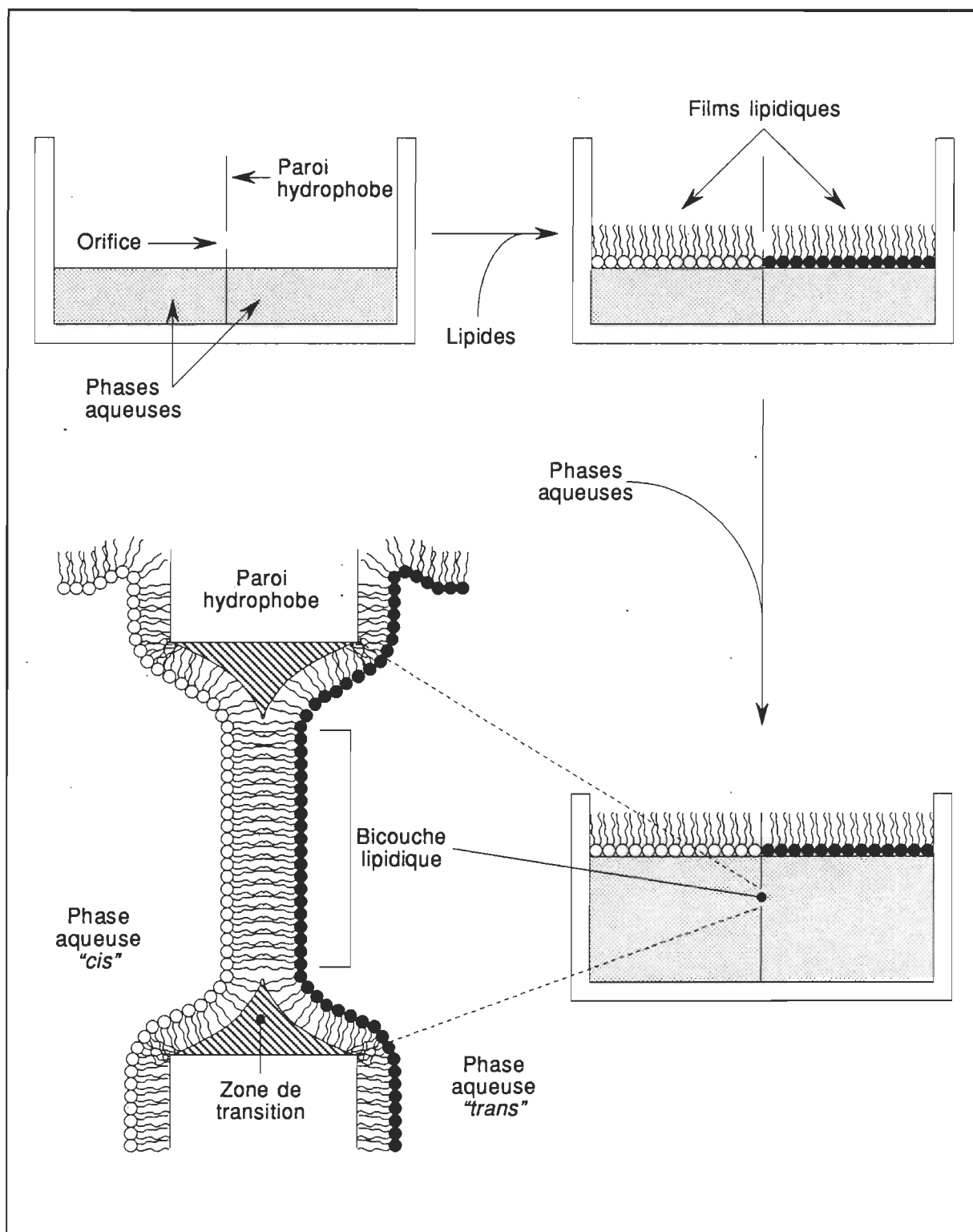


Figure 1.6. – Formation d'une bicouche asymétrique selon la technique de Montal-Mueller. (Les schémas ne sont pas dessinés à l'échelle).

Une autre possibilité de former des bicouches asymétriques serait d'exciser à l'aide d'une micropipette une portion d'une bicouche asymétrique du type Montal-Mueller. Cela ne doit pas être aisé puisqu'aucune tentative n'a été rapportée dans la littérature.

Le travail, ici présenté, concerne la caractérisation de la barrière de potentiel existant au sein de bicouches asymétriques. Cette caractérisation permettra éventuellement d'évaluer le potentiel transmembranaire et de corrélérer cette valeur avec le degré d'asymétrie de la membrane ou encore de la relier à une modification de la composition des milieux ioniques bordant la membrane. Les membranes utilisées pour l'étude seront formées à l'aide de la technique conventionnelle de Montal. Il s'agit maintenant d'examiner par quels moyens nous pouvons mesurer ces potentiels membranaires.

1.4 Mesure des potentiels membranaires

Les bicouches Montal-Mueller étant des structures fragiles, on ne peut, contrairement aux liposomes et aux films monomoléculaires, les étudier par une panoplie de techniques. Notre choix se limite ici à la spectroscopie de fluorescence (vu sa grande sensibilité) et les mesures électriques (aisées, vu la configuration du système). Dans les deux cas, il est possible de mesurer les potentiels existant à la surface et au sein de la bicouche Montal-Mueller.

1.4.1 Méthodes spectroscopiques

En plus de requérir une instrumentation un peu lourde à mettre en oeuvre (Robert & coll., 1985), l'emploi de sondes fluorescentes amphipathiques comporte deux désavantages majeurs. Premièrement, ces sondes ne sondent qu'un endroit particulier de la membrane et, par conséquent, nous devons utiliser une série de sondes différentes si l'on veut sonder sur toute l'épaisseur de la membrane. Deuxièmement, les intensités de fluorescence sont difficilement "traduites" en mesures de potentiel. Plusieurs raisons sont à l'origine de l'actuelle difficulté de "traduction": parmi celles-ci mentionnons la localisation imprécise de la sonde dans la membrane (et parfois variable, surtout à forte concentration), l'absence d'une échelle de rendement quantique en fonction des paramètres physiques du milieu (la permittivité diélectrique et la microviscosité par exemple), les différences d'affinité de la

sonde pour les différents constituants membranaires, la modification de l'environnement électrostatique à l'étude (les sondes fluorescentes étant évidemment chargées) et la possibilité de diffusion de l'autre côté de la membrane (perte de signal). La sonde fluorescente qui posséderait les attributs les plus recherchés demeure, selon Cafiso & coll. (1989), le TNS, une sonde se localisant à la surface de la membrane. Aucune mesure n'a toutefois été faite à ce jour sur une membrane Montal-Mueller. Il faut dire que deux équipes seulement ont publié des résultats de fluorescence sur bicouches Montal-Mueller (Fahey & Webb, 1978 et Robert & coll., 1985).

1.4.2 Méthodes électriques

Par contre, les mesures électriques, en particulier les mesures de capacité en fonction de la tension et les mesures de conductance de bicouches dopées avec des ionophores (canaux et transporteurs) ou encore avec des ions liposolubles, nous apportent de précieuses indications sur les potentiels membranaires.

Les mesures de capacité en fonction de la tension permettent de déterminer le potentiel à la surface de la membrane sans l'utilisation de sondes extrinsèques de potentiel. La technique repose sur le phénomène d'électrocompression. À l'instar d'un condensateur soumis à une différence de potentiel, la membrane soumise à une différence de potentiel transmembranaire subit une compression mécanique qui tend à amincir la membrane. Cette force, proportionnelle au carré de la différence de potentiel, s'annule lorsque la différence de potentiel est égale à zéro. La mesure de capacité étant inversement proportionnelle à l'épaisseur du milieu hydrocarboné (nous verrons cela au chapitre 3), la capacité sera minimale lorsque la bicouche ne sera soumise à aucune force électrocompressive. Pour une bicouche symétrique, dans des conditions symétriques, cela se produira sans que l'on ait à appliquer une différence de potentiel externe. Par contre, si la membrane est sujette à une différence de potentiel transmembranaire, nous devons, pour obtenir une capacité minimale, appliquer une différence de potentiel égale et de signe opposé à la différence de potentiel transmembranaire. Cette technique de détermination du potentiel transmembranaire est appelée dans la littérature « capacitance minimization technique ».

Depuis 1966 (Babakov & coll.), de nombreux chercheurs ont effectué des mesures de capacité en fonction de la tension afin d'évaluer la compressibilité des films noirs, mais en

ce qui concerne les films Montal-Mueller, il a fallu attendre l'étude d'Alvarez & Latorre en 1978. Cela s'explique du fait que les bicouches Montal-Mueller, étant pratiquement exemptes de solvant, sont peu compressibles et qu'il faut donc, si l'on veut prendre une courbe capacité-tension digne de ce nom, se doter d'un dispositif de mesure capable de mesurer des variations de capacité de l'ordre de 0,01%. Seules deux équipes, l'une américaine (Vodyanoy & coll., 1988) et l'autre japonaise (Toyama & coll., 1991), ont su renouveler l'exploit. En plus d'être techniquement exigeantes, les mesures capacité-tension ne fournissent aucune indication sur le potentiel à l'intérieur de la bicouche ni sur la valeur absolue des potentiels sur chacune des interfaces membranaires.

Par contre, grâce aux mesures de conductance de bicouches dopées, un profil du potentiel intramembranaire peut être dessiné. Cela se conçoit aisément puisqu'ici nos indicateurs de potentiels traversent entièrement la bicouche. Néanmoins, il faut s'assurer que la sonde de potentiel n'affecte pas le potentiel que l'on veut déterminer. Ces deux techniques (mesures de capacité et de conductance) se complètent bien et l'idéal serait de les utiliser toutes deux, mais vu la contrainte technique mentionnée plus haut, notre projet et nos propos porteront sur les mesures de conductance de bicouches dopées ⁵.

Par mesure de conductance, nous entendons à la fois la conductance statique à faible tension, obtenue en divisant le courant traversant la membrane à une tension fixe par la valeur de cette tension, et la mesure de conductance en fonction de la tension, que l'on obtient en mesurant le courant à différentes tensions (en régime dynamique ou non). Les bicouches phospholipidiques étant de nature très peu conductrices, la détermination des potentiels par la mesure de la conductance nécessite l'utilisation d'ionophores (favorisant le transport des ions) ou d'ions liposolubles (traversant facilement la bicouche). Des canaux, transporteurs et ions liposolubles, les seconds sont les plus utilisés en tant que sondes de potentiel. Rappelons que les canaux sont des peptides ou des protéines traversant entièrement la bicouche et qui, comme leur nom l'indique, laissent un passage aux ions. Le hic ici c'est que ceux-ci en passant à l'intérieur du canal ne ressentent, au travers du squelette polypeptidique, qu'un faible reflet du potentiel intramembranaire. Sans oublier que des charges à l'entrée du canal peuvent affecter la conductance membranaire. En ce qui

⁵ Par bicouches dopées, nous entendons des bicouches incorporant un constituant supplémentaire. Cette incorporation peut se faire, soit via les phases aqueuses bordant la membrane, soit en déposant la substance de concert avec les lipides à l'interface.

concerne les ions liposolubles, la situation n'est pas facile non plus. Les ions liposolubles traversent bien la bicouche et font en sorte que les courants deviennent facilement mesurables mais leur affinité pour la membrane est telle qu'ils perturbent la barrière de potentiel que l'on veut mesurer. Par contre, les transporteurs utilisés comme sondes de potentiel ne sont pas chargés et sont moins sensibles à des situations de ce type. Les transporteurs fixent un ion d'un côté de la membrane, ressentent le champ électrique, traversent la bicouche et relarguent leur "charge" sur l'autre face, prêts à intervenir de nouveau. Pour ces raisons et vu l'abondance de la littérature, nous opterons pour l'emploi de transporteurs. Des transporteurs habituellement utilisés (beauvericine, enniatine, nonactine, trinactine, valinomycine), nous retiendrons la nonactine, pour des raisons qui apparaîtront plus évidentes au chapitre 2.

En résumé, nous comptons caractériser les potentiels électrostatiques des bicouches phospholipidiques du type Montal-Mueller en les dopant à la nonactine et en effectuant des mesures courant-tension. Nous verrons au chapitre 2 quelle est la nature de ces potentiels et comment l'on peut extraire la barrière de potentiel des courbes courant-tension obtenues. La méthodologie expérimentale employée sera décrite au chapitre 3. Au chapitre suivant apparaîtront différentes observations concernant la formation de la bicouche Montal-Mueller et les petits caprices de la technique. L'ensemble des résultats obtenus seront présentés et discutés au chapitre 5. Une discussion générale suivra.

CHAPITRE II

ASPECTS CONCEPTUELS ET THÉORIQUES

2.0 Introduction

Considérant l'importance du cadre théorique - d'un cadre intelligible - dans toute entreprise scientifique, nous avons cru bon de lui accorder ici une place de choix. L'exposé de ce cadre théorique se veut général, précis et cohérent. Il apparaîtra à certains comme une enflure un peu exagérée, mais permettra à d'autres, nous espérons, une lecture plus fine des données présentées ainsi que des propos s'y joignant.

Ce chapitre se divise en trois sections: la première portera sur la modélisation de la barrière de potentiel d'une bicouche asymétrique, la seconde, plus courte, sur le mécanisme d'action d'un transporteur, et la troisième, sur la modélisation du transport de particules chargées dans un champ électrique.

2.1 Les potentiels membranaires

Cette section traitera à la fois des potentiels intrinsèques à la membrane (potentiel de Gouy et potentiel dipolaire) et des potentiels reliés à l'interaction de la charge-sonde avec la membrane (potentiel de Born, potentiel des forces images et potentiel de distribution). Le potentiel de Gouy est dû à la présence de charges nettes à la surface de la membrane, tandis que le potentiel dipolaire est dû à la présence de dipôles à l'interface membranaire.

2.1.0 Terminologie

La situation peut vite devenir embrouillée si l'on ne prend garde à la signification physique des termes utilisés. Il faut s'assurer toujours de la signification physique des termes utilisés et se la garder présente à l'esprit. Nos concepts: ce sont nos objets et nos outils de recherche. Nous nous devons d'en prendre soin. À ce stade ci, deux termes se doivent d'être éclaircis: ceux de "potentiel de membrane" et de "potentiel de surface". Pour les autres concepts, nous ferons, le temps venu, les distinctions qui s'imposent.

Généralement les physiologistes utilisent le terme *potentiel de membrane* («membrane potential») pour désigner la différence de potentiel électrique que l'on peut mesurer à l'aide de microélectrodes entre les milieux intra- et extracellulaires. Toute différence de concentration (ou de manière moins restrictive, d'activité) d'une ou de plusieurs espèces chargées de part et d'autre d'une barrière semi-perméable crée une différence de potentiel de ce type. Ainsi, une différence de concentration d'un ion monovalent d'un facteur 10 de part et d'autre d'une membrane perméable à cet ion crée entre les deux compartiments une différence de potentiel d'environ 60 mV. Mais ce qu'il faut souligner ici c'est que les différences de potentiels mesurées, même à 10 nm de la surface membranaire, ne sont pas nécessairement celles existant tout juste aux abords de la membrane. Rappelons-nous que les membranes biologiques sont électrostatiquement asymétriques. Ainsi, si à l'aide d'électrodes l'on mesure sur des neurones au repos une différence de potentiel de l'ordre de -70 mV (l'intérieur de la cellule étant plus négatif que l'extérieur), il ne faut pas en conclure que la différence de potentiel transmembranaire (la différence de potentiel de part et d'autre de l'axolemmes) est de -70 mV. Une très belle étude d'Heinrich & coll. (1982) montre que la différence de potentiel transmembranaire de part et d'autre de la membrane érythrocytaire peut différer de plus de 100 mV de celle mesurée avec des microélectrodes. Elle peut également être de signe opposé. Ce phénomène a été observé expérimentalement sur la membrane de vacuoles isolées (Barbier-Brygoo & coll., 1985). Les auteurs obtiennent une différence de potentiel de +13 mV avec des microélectrodes et de -60 mV à l'aide d'une sonde moléculaire (l'ion liposoluble TPP⁺).

Les potentiels reliés au déséquilibre des activités des espèces ioniques sont discutés abondamment dans de nombreux volumes (Heinz, 1981; Finkelstein & Mauro, 1977;

Matthews, 1986). Ils ne feront pas ici l'objet d'un traitement particulier. Signalons en terminant que ces potentiels, décrits par la loi de Nernst ou par la loi plus générale de Goldman-Hodgkin-Katz, sont parfois appelés potentiels de diffusion, potentiels nernstiens ou encore potentiels macroscopiques.

Par potentiels membranaires, il faut entendre ceux présents à la surface (ou très près) de la membrane et au sein même de celle-ci. Ils sont intimement reliés à la structure et à la composition de la membrane (biologique ou modèle), mais également des milieux la bordant. La mesure des potentiels membranaires réclame, contrairement aux potentiels nernstiens, l'emploi d'indicateurs de dimension moléculaire (voir section 1.4), l'épaisseur de la membrane n'atteignant, sauf exception, que 5 à 7 nanomètres tout au plus.

Examinons maintenant le second terme ambigu, celui de *potentiel de surface* («surface potential»). Pour un chercheur spécialiste des films monomoléculaires, le potentiel de surface n'a pas la même signification que pour celui s'escrimant sur des bicouches lipidiques planes; pourtant, les deux oeuvrent dans la même sphère de recherche, celle des modèles de membranes biologiques. Ce qu'il faut remarquer ici, et c'est ce qui cause souvent l'embarras, c'est qu'un même terme général fait référence à deux situations différentes bien précises.

Dans la littérature des films monomoléculaires, le terme potentiel de surface réfère à la *mesure* de la variation du potentiel de Volta ⁶ à l'interface air-eau (ou air-huile) suite à la présence d'un film (monomoléculaire ou non) d'un amphiphile. Le potentiel de surface est alors symbolisé par ΔV . Dans la littérature des bicouches planes, et des membranes en général, le potentiel de surface correspond au potentiel dû à la double couche électrique à une position $x = 0$ définie comme étant la "surface" de la membrane. Il est symbolisé généralement par ψ_0 . En fait, les deux dénominations sont trompeuses car dans le premier cas ΔV inclut, outre le potentiel ψ_0 (dans l'éventualité d'un amphiphile chargé), des potentiels contribuant au potentiel à l'*intérieur* de la membrane (potentiel dipolaire et de distribution); alors que dans le second cas, le potentiel de surface (ou plus précisément le potentiel à la surface) réfère à la *seule* contribution du potentiel dû à la double couche

6 Le potentiel de Volta est défini par la différence entre les potentiels extérieurs de deux phases de composition différente (Hunter, 1981).

électrique à la surface. Ceci explique que l'on puisse lire qu'un film de PE possède un potentiel de surface de +420 mV (s'il s'agit d'un film de PE à l'interface air-eau) et, par ailleurs, qu'un film de PE (s'il s'agit d'un film bilipidique de PE) ne possède pas de potentiel de surface !

Ainsi donc, au lieu de potentiel de surface, nous utiliserons pour ΔV le terme différence de potentiel à l'interface air-eau, indistinctement les termes potentiels de Gouy à la surface et potentiel dû à la double couche à la surface lorsqu'il sera question de ψ_0 .

2.1.1 Potentiel dû à la double couche électrique ou potentiel de Gouy

Nous discuterons dans un premier temps de la notion de double couche électrique. Nous exposerons ensuite l'essentiel de la théorie qui lui est depuis longtemps associée, la théorie de Gouy-Chapman (équations-clé, domaine de validité). Dans la même foulée, nous traiterons de l'adsorption d'espèces ioniques sur une surface chargée (théorie de Gouy-Chapman-Stern) et des complications s'y rattachant. Nous attaquerons ensuite la seconde contribution au potentiel membranaire intrinsèque, le potentiel dipolaire.

2.1.1.1 Notion de double couche électrique

Imaginons un métal possédant à sa surface une charge électrique nette que l'on plonge dans un milieu (une solution d'électrolytes) contenant un grand nombre de charges mobiles (ions). Ce milieu, macroscopique, contient un nombre égal de charges positives et de charges négatives (électroneutralité de la phase solution électrolytique). Evidemment, en plongeant le métal chargé dans la solution, nous assistons au voisinage de l'interface métal-solution à une redistribution spatiale des espèces ioniques: les ions de signe opposé au signe de la charge surfacique (les contre-ions) se rapprochent de l'interface alors que les ions de même signe (les co-ions) sont repoussés vers le coeur de la solution («bulk water phase»). La petite région de la solution près de l'interface n'est donc plus électroneutre. Nous y retrouvons un excès de contre-ions et cet excès correspond exactement à la charge portée par le métal: le système métal-solution environnante est électroneutre, tout comme le système en son entier. Nous nous retrouvons donc avec une couche de charges à la surface et une seconde "couche" de charges de signe opposé tout juste à côté dans la solution, d'où l'appellation double couche électrique

Qui dit excès, ou séparation de charges, dit différence de potentiel électrique. Mais pour quantifier ce potentiel, nous devons connaître la distribution spatiale des charges dans la solution. Gouy en 1910 et Chapman en 1913 avancèrent une théorie dite de la double couche diffuse selon laquelle les ions se retrouvent répartis statistiquement dans la solution (d'où le terme diffus). Signalons que c'est grâce aux faibles interactions s'exerçant entre les molécules qu'une distribution statistique définie peut apparaître ⁷ (il n'est pas question ici d'une distribution au hasard !). Plus précisément, la concentration des ions varie tout au long de la couche diffuse dépendamment du champ électrique local que ressent l'ion. Il faut se rendre compte qu'au champ émis par la surface chargée s'ajoute celui dû aux ions eux-mêmes; et c'est ce champ résultant (local) qui régit la distribution des ions, laquelle... La situation, comme nous le voyons déjà, ne frôle pas l'évidence.

La distribution ionique ne dépend pas seulement du champ électrique local mais aussi de la température. À haute température, la tendance diffusionnelle des ions est augmentée et la couche devient plus diffuse, plus étendue. L'inverse se produit à basse température, la couche devenant plus compacte. Plus exactement, la concentration de l'espèce chargée dépend du rapport entre l'énergie potentielle électrique, U_e , et l'énergie thermique, kT . Ainsi lorsque nous nous éloignons de la surface, le rapport U_e / kT diminue, de même que le rapport contre-ions / co-ions, jusqu'à ce que loin de la surface, lorsque $U_e \ll kT$, la concentration des ions dans la couche diffuse ne diffère plus de celle existant dans le cœur de phase. Les concentrations de co-ions et de contre-ions redeviennent égales et la notion de couche électrique perd son sens. Nous retrouvons à la **figure 2.1**, une illustration des doubles couches se trouvant au voisinage d'une membrane chargée. Le *profil* des concentrations et des potentiels y est représenté.

⁷ En termes plus techniques, ces faibles interactions amènent l'ergodicité du système (Léontovitch, 1986, p.196)

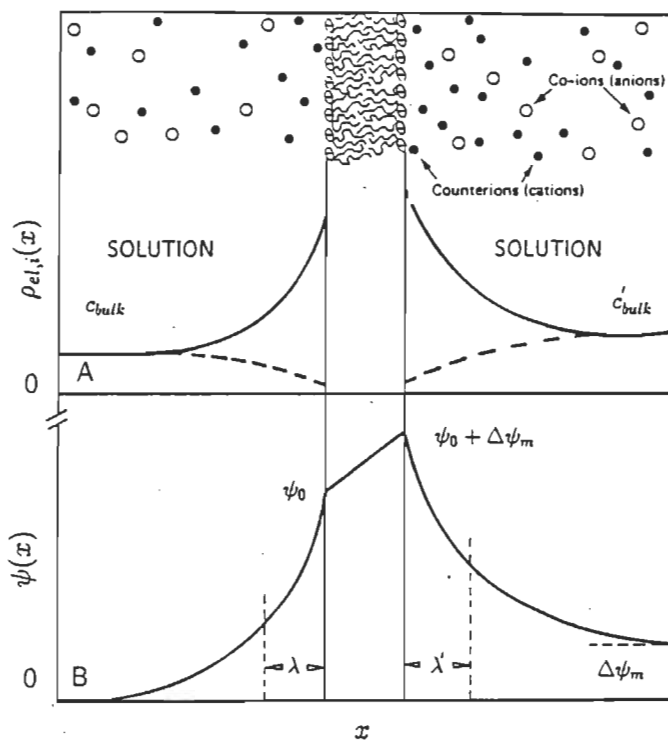


Fig. 2. Ion distribution profile, $\rho_{el,i}(x)$ (A), and electrostatic potential, $\psi_{el,i}(x) = \psi(x)$ (B), near a charged membrane with an applied transmembrane potential, $\Delta\psi_m = V$ and surface potential ψ_0 . Dashed line depicts the distribution of co-ions and full line of counterions. Owing to the juxtaposition of the structural and counterionic charges and because the concentration of the latter falls-off continuously with separation from the surface (see symbols with a plus sign in the upper picture) it is customary to speak of the surface associated ionic diffuse double layer. Far from the membrane the concentration of counterions and co-ions is the same as in the bulk (c_{bulk}). Dotted line in the lower graph delineates the range to which the electrostatic interactions typically play an important rôle; this range is proportional to Debye screening length, λ .

Figure 2.1. – Illustration des doubles couches électriques bordant une membrane. En A: profil de la concentration des co-ions et des contre-ions. En B: profil du potentiel dû à la présence des doubles couches. (Tiré de Cevc, 1990).

2.1.1.2 Théorie de Gouy-Chapman

Quelle est l'énergie potentielle d'une charge positive se trouvant à une distance x de la surface chargée ? D'une charge se trouvant tout juste à la surface (à $x = 0$) ? Quelle est la valeur du potentiel électrique en tout point à l'intérieur de la couche diffuse ? Quelle est la concentration ionique à une distance x ? La théorie de Gouy-Chapman permet de répondre à ces questions.

La théorie repose sur deux équations fondamentales: celle de Poisson et celle de Boltzmann. L'équation de Poisson permet de relier densité volumique (nette) de charge et potentiel électrique, et ceci en tout point de l'espace ⁸. Si la surface chargée est plane et infinie, le champ électrique émis par la surface est rigoureusement perpendiculaire à la surface et la redistribution des ions ne s'effectue que dans cette direction (disons l'axe des x). Les concentrations ioniques sont constantes selon y et z , tout comme le champ et le potentiel électriques. S'il en est ainsi et que nous considérons de plus le milieu électrolytique comme un diélectrique homogène (c.-à-d. un diélectrique dont la permittivité relative ne dépend pas des coordonnées x,y,z), l'équation de Poisson prend la forme simplifiée suivante :

$$D_x^2 \psi(x) = - \frac{\rho(x)}{\epsilon_0 \epsilon_w} \quad [2.1]$$

- $\psi(x)$: potentiel électrostatique à une distance x de l'interface (V)
- ϵ_0 : permittivité du vide (= 8,854 188 pF·m⁻¹)
- ϵ_w : permittivité relative du milieu (-)
- $\rho(x)$: densité volumique de charge à une distance x (C·m⁻³)

La densité nette de charges, égale à la différence entre la densité des charges positives et négatives, est donnée par:

⁸ Notons ici que si, mathématiquement, les volumes peuvent tendre vers l'infiniment petit; il n'en est pas de même physiquement, où le petit ne se rapetisse pas indéfiniment.

$$\rho(x) = \sum_{i=1}^n Z_i \mathcal{F} C_i(x) \quad [2.2]$$

- Z_i : valence de l'ion i (positive pour les cations, négative pour les anions)
 \mathcal{F} : constante de Faraday (= 96 484,6 C·mol⁻¹)
 $C_i(x)$: concentration de l'ion i à une distance x (mol·m⁻³)

Signalons que la sommation s'effectue sur toutes les espèces ioniques i (cations et anions compris). Il en sera de même pour les équations subséquentes.

Mais voilà: quelle est la concentration de l'espèce ionique i en fonction de la distance de l'interface? Comment relier $C_i(x)$ et x ?... À l'équilibre le potentiel électrochimique de l'ion dans la solution, $\tilde{\mu}_i$ est partout le même, que ce soit à l'intérieur de la couche diffuse ($x \in [0, \infty[$) ou dans le coeur de phase ($x = \infty$) :

$$\tilde{\mu}_i(x) = \tilde{\mu}_i(\infty) \quad [2.3]$$

À pression et température constantes, $\tilde{\mu}_i$ peut s'exprimer, en posant le coefficient d'activité égal à 1 comme :

$$\tilde{\mu}_i(x) = \tilde{\mu}_i^0(x) + RT \ln C_i(x) + Z_i \mathcal{F} \psi(x) \quad [2.4]$$

- $\tilde{\mu}_i^0$: potentiel électrochimique standard (J·mol⁻¹)
 R : constante des gaz parfaits (= 8,3144 J·mol⁻¹·K⁻¹)

En substituant l'équation 2.4 dans 2.3 nous obtenons l'équation de Boltzmann :

$$C_i(x) = C_i(\infty) \exp\left(\frac{-Z_i \mathcal{F} \psi(x)}{RT}\right) \quad [2.5]$$

- $C_i(\infty)$: concentration de l'ion i dans le coeur de phase (mol·m⁻³)

Et en jumelant les équations 2.1 et 2.5, celle de Poisson-Boltzmann:

$$D_x^2 \psi(x) = -(\epsilon_0 \epsilon_w)^{-1} \cdot \sum_{i=1}^n Z_i \mathfrak{I} C_i(\infty) \exp\left(\frac{-Z_i \mathfrak{I} \psi(x)}{RT}\right) \quad [2.6]$$

Cette dernière opération, d'apparence somme toute anodine, constitue la pierre d'achoppement de la théorie de Gouy-Chapman. Nous verrons plus loin pourquoi il en est ainsi. L'équation de Poisson-Boltzmann est une équation différentielle du deuxième ordre, non linéaire (la quantité cherchée y figurant dans l'argument de l'exponentielle), ne possédant pas de solution analytique. Il existe cependant quelques cas particuliers pour lesquels la résolution de l'équation est possible. Ainsi par exemple pour un mélange d'électrolytes symétriques soit univalents (type 1:1) tels le KCl et le NaCl, soit divalents (type 2:2) comme le $MgSO_4$ et le $CaCO_3$, ou encore tri- ou tétravalents. Pour ces cas particulièrement simples, nous pouvons résoudre analytiquement l'équation 2.6 et la solution, reliant explicitement ψ , C_i et x , s'avère celle recherchée.

En intégrant l'équation 2.6 une première fois entre $\psi = 0$ et $\psi = \psi$, nous obtenons, $D_2\psi(x)$ valant 0 à $\psi = 0$ (c'est à dire à $x = \infty$):

$$D_x \psi(x) = \pm \left[\left(\frac{2 RT}{\epsilon_0 \epsilon_w} \right) \cdot \sum_{i=1}^n C_i(\infty) \left\{ \exp\left(\frac{-Z_i \mathfrak{I} \psi(x)}{RT}\right) - 1 \right\} \right]^{1/2} \quad [2.7]$$

Pour un mélange de sels d'un seul type Z-Z :

$$D_x \psi(x) = - \sqrt{\frac{8 RT \sum_{i=1}^n C_i(\infty)}{\epsilon_0 \epsilon_w}} \sinh\left(\frac{-Z_i \mathfrak{I} \psi(x)}{2 RT}\right) \quad [2.8]$$

Regroupant les termes de l'équation 2.8 en ψ à gauche et ceux en x à droite, puis en intégrant d'un côté entre $\psi = \psi$ et $\psi = \psi(0)$ et de l'autre entre $x = x$ et $x = 0$, il vient :

$$\psi(x) = \frac{4 RT}{Z_i \mathfrak{I}} \tanh^{-1} \left[\tanh\left(\frac{Z_i \mathfrak{I} \psi(0)}{4 RT}\right) \cdot \exp(-\kappa x) \right] \quad [2.9]$$

avec

$$\kappa = \sqrt{\frac{2 Z_i^2 \mathfrak{I}^2 \sum_{i=1}^n C_i(\infty)}{\epsilon_0 \epsilon_w RT}}$$

$\psi(0)$: potentiel électrostatique de la double couche à la surface (V)
 κ : inverse de la longueur de Debye (m⁻¹)

Le profil de décroissance du potentiel connu, il nous faut maintenant déterminer $\psi(0)$ afin de connaître la valeur absolue de $\psi(x)$. Cela s'avère possible si la densité superficielle de charges, σ , est connue. En effet, en vertu de l'électroneutralité du système surface-solution, nous pouvons écrire :

$$\sigma = - \int_0^{\infty} \rho(x) dx \quad [2.10]$$

σ : densité superficielle de charges (C•m⁻²)

et en utilisant l'équation de Poisson, nous obtenons :

$$\sigma = - (\epsilon_0 \epsilon_w) \cdot D_x \psi(x) \big|_{x=0} \quad [2.11]$$

Substituant dans 2.11 la valeur de $D_x \psi$ à $x=0$ obtenue grâce à l'équation 2.8 nous obtenons, pour tout mélange d'électrolytes, l'équation suivante :

$$\sigma = \pm \left[2 \epsilon_0 \epsilon_w RT \cdot \sum_{i=1}^n C_i(\infty) \left\{ \exp\left(\frac{-Z_i \mathfrak{I} \psi(0)}{RT}\right) - 1 \right\} \right]^{1/2} \quad [2.12]$$

Cette dernière relation est connue sous le nom d'équation de Grahame. Pour un mélange d'électrolytes symétriques de même valence, la sommation se simplifie et une relation simple entre σ et $\psi(0)$ peut être obtenue :

$$\sigma = \sqrt{8 \epsilon_0 \epsilon_w RT \cdot \sum_{i=1}^n C_i(\infty) \cdot \sinh\left(\frac{Z_i \int \psi(0)}{2 RT}\right)} \quad [2.12b]$$

Cette relation est connue sous le nom d'équation de Gouy. (Pour une dérivation complète des équations 2.9 et 2.12 voir Fripiat & coll., 1971, § 7.1)

Pour un mélange d'électrolytes un peu plus compliqué, l'équation de Poisson-Boltzmann se montre intraitable, ou à tout le moins difficilement traitable, même pour une géométrie plane. Quelques cas seulement se sont trouvés résolus à ce jour. Il s'agit des mélanges d'électrolytes de type 1:1 et 2:2 (KCl + MgSO₄ p.ex.) (Barber & coll., 1977), de type 1:1 et 2:1 (KCl + CaCl₂ p.ex.) (Abraham-Schrauner, 1975; Rubin & Barber, 1980), et de type 1:1, 2:1, 1:2 et 2:2 (Bentz & Nir, 1980).

2.1.1.3 Inconsistance fondamentale de la théorie de Gouy-Chapman

Nous disions au paragraphe précédent qu'il n'existe pas de solution générale de l'équation de Poisson-Boltzmann. Nous pouvons par contre, peu importe le mélange d'électrolytes, trouver une solution numérique. Mais le calcul fût-il le plus précis, la solution demeurera toujours entachée d'une erreur: erreur que l'on peut qualifier de fondamentale parce qu'inhérente à la théorie. Cette erreur survient lorsque nous associons les équations de Poisson et de Boltzmann.

La plupart des auteurs (McLaughlin, 1977; Barber, 1980) amènent l'inconsistance sur le tapis en affirmant, sans cérémonie aucune, que le potentiel apparaissant dans le membre de droite (équation de Poisson) est le potentiel électrostatique moyen alors que celui apparaissant à gauche (équation de Boltzmann) est le potentiel agissant sur l'ion. Les deux potentiels n'étant pas équivalents, l'un étant macroscopique et l'autre microscopique (micropotential), l'équation s'en trouverait faussée.

Le problème de l'inconsistance fondamentale peut être posé de différentes manières. Certains auteurs (Bockris & Reddy, 1970; Conway, 1970; Quintin, 1970) l'abordent du côté "Poisson", en faisant remarquer que l'équation de Poisson repose implicitement sur la superposition des potentiels électriques; ce qui en l'occurrence n'est pas le cas puisque la relation entre densité de charges et potentiel, donnée par la loi de Boltzmann, n'est pas

linéaire. L'équation de Poisson n'est d'ailleurs strictement valable que pour des potentiels dérivés de forces en $1/r^2$ (forces centrales) comme les forces coulombiennes (Kalachnikov, 1980, p. 29). Quintin souligne aussi que pour des solutions concentrées, le potentiel que ressent un ion dépend fortement de la position des ions du voisinage et que la densité volumique de charge ne peut alors être considérée continue, ce qui est contraire à l'esprit de la loi de Poisson (l'infiniment petit cause ici problème...).

Dans le même ordre d'idées, nous pouvons mettre le doigt sur l'inconsistance fondamentale en faisant passer l'équation de Poisson, pour le cas qui nous préoccupe, d'une forme macroscopique à une forme microscopique. L'on peut démontrer que l'inconsistance peut être levée - dans cet ordre d'idées - si la valeur moyenne $\langle \exp(Z\psi/RT) \rangle$ est à peu près égale à $\exp \langle Z\psi/RT \rangle$. Cela vaut pour des potentiels plus petits que 25 mV environ.

D'autres auteurs regardent le problème par la droite en critiquant l'équation de Boltzmann telle qu'apparaissant à l'équation 2.5. Poser d'emblée le coefficient d'activité comme étant égal à 1, c'est plutôt baroque, avouons-le. Une démonstration plus rigoureuse nous aurait amené une expression similaire où l'argument de l'exponentielle serait donné par W / RT , où W est le potentiel de force moyenne. Le potentiel de force moyenne correspond selon Bockris & Reddy (1970) à l'énergie nécessaire pour amener la concentration ionique de $C_i(\infty)$ à $C_i(x)$, en incluant les interactions à courte portée, non coulombiennes. Le potentiel est dit de force moyenne car il est calculé en faisant une moyenne dans le temps des interactions. Dans les volumes plus spécialisés (Fowler & Guggenheim, 1965; Fowler, 1966), le potentiel de force moyenne entre un ion i et un ion j est défini comme étant le travail requis pour amener de l'infini l'ion i à une distance r de j , travail moyenné en tenant compte de toutes les configurations possibles des autres ions. Léontovitch (1986) à la page 216 résume:

“ On notera que lorsqu'on ne peut pas négliger les forces d'interaction mutuelle entre les particules, la formule de Boltzmann cesse en général d'être valable (...). Dans certains cas, les forces s'exerçant sur une particule peuvent être assimilées, de façon approchée, à des forces extérieures (en posant que la distribution de toutes les autres particules est donnée). On peut alors utiliser l'équation de Boltzmann pour la distribution des particules suivant les vitesses et les coordonnées en tant que formule approchée. ”

Les thermodynamiciens statisticiens (Fowler, 1966; Fowler & Guggenheim, 1965; Münster, 1974) traitent le problème de l'inconsistance de la manière qui m'apparaît la plus adéquate. Ces auteurs, à l'aide des outils et méthodes de la mécanique statistique (équations intégrales, «cluster theories», etc.), examinent l'équation de Poisson-Boltzmann sous tous ses revers, en testent "l'auto-consistance" et finalement déterminent les conditions de validité de l'équation. Si ces conditions ne sont pas respectées, les fluctuations deviennent importantes (le potentiel de force moyenne s'écarte de sa valeur moyenne et du potentiel électrostatique moyen) et l'équation de Poisson-Boltzmann perd alors sa consistance. L'équation peut être prise en défaut si par exemple la force ionique est trop élevée ou si les rayons ioniques sont trop petits.

2.1.1.4 Autres limitations de la théorie de Gouy-Chapman

Comme nous venons de le voir la théorie de Gouy-Chapman est viciée en son sein même. Sauf approximations, le potentiel électrostatique moyen n'est pas égal au potentiel de force moyenne. Pour certains, le problème en est un de forme, mais tellement sérieux que l'approche doit être rejetée. D'autres - plus pragmatiques dirions-nous - relativisent le problème: le cadre de la théorie de Gouy-Chapman est un cadre théorique acceptable, avec ses limitations, comme tout cadre théorique. Ce qui compte selon eux, c'est de garder les limitations de la théorie présentes à l'esprit, et tâcher si possible de les lever. Prenons pour l'instant le parti de ces derniers et regardons ce que la théorie présuppose.

La théorie de Gouy-Chapman présuppose une surface i) infiniment plane où les charges surfaciques seraient ii) réparties uniformément (de manière à former un continuum de charges et iii) limitées à ce plan. Le milieu liquide de la couche diffuse est considéré comme iv) non structuré, et ayant v) une même permittivité relative en tout point. Les ions sont considérés comme étant vi) ponctuels, et les seules forces s'exerçant sur eux sont vii) d'origine coulombienne. De plus la théorie ne tient aucunement compte de la possibilité viii) d'une pénétration des ions en deçà du plan chargé ou encore ix) d'une adsorption (spécifique ou non) de ces mêmes ions à la surface.

Plusieurs chercheurs ont tenté de corriger les équations afin de tenir compte de ces limitations, d'approcher la théorie (idéale) du terrain expérimental en quelque sorte. Mais cet exercice s'est souvent accompli au prix de mille complications. Prenons le cas de la

permittivité de la double couche. Celle-ci dépend en grande partie du degré de polarisation orientationnelle des molécules de solvant (lequel est fonction du champ électrique local), mais dépend aussi des concentrations ioniques (dépendant du potentiel de force moyenne), de l'électrostriction des molécules de solvant (dépendant du champ environnant et de la compressibilité du solvant) et de l'organisation du liquide (longueurs de corrélation, etc.). Or le potentiel de force moyenne dépend des interactions à courte portée ion-ion et ion-solvant, lesquelles peuvent être abordées par le biais des forces d'hydratation (lesquelles sont fonctions de la charge et du rayon de l'ion, et de la permittivité du coeur de phase et de celle de la couche diffuse) ou encore en ajoutant au potentiel électrostatique moyen, le potentiel de cavité ⁹, le potentiel de self-atmosphère ¹⁰ (fonction du rayon ionique, de la force ionique et du potentiel électrostatique moyen), le potentiel dû à la polarisation des ions et des molécules de solvant ¹¹, le potentiel dû aux forces images s'exerçant sur l'ion et son nuage au voisinage de la surface chargée (fonction du rayon ionique, de la force ionique, de la distance de l'interface, de la permittivité du milieu au-delà de l'interface), etc. Comme ces potentiels dépendent de la permittivité du milieu, la situation devient vite inextricable. Et je n'ai discuté que de la permittivité relative...

Personne n'a pu à ce jour tenir compte de toutes ces corrections dans leur ensemble. Quelques-unes toutefois ont pu être mieux cernées. Parmi ces tentatives, plusieurs méritent d'être soulignées. Mentionnons i) l'article d'Ohshima, Healy & White (1982) où nous retrouvons une solution analytique très précise de l'équation de Poisson-Boltzmann pour une double couche sphérique et celui de James & Williams (1985) pour une solution numérique s'appliquant à toute géométrie, ii) les articles de Nelson & McQuarrie (1975), Sauvé & Ohki (1979), et Duniec & Thorne (1983) sur les effets de charges discrètes, iii) l'article de Cevc, Svetina & Zeks (1981) sur l'effet de distributions transverses de

⁹ L'ion de par sa simple présence crée une cavité dans le milieu diélectrique et ce faisant, affecte la permittivité du milieu (effet cavité). La perturbation du potentiel moyen environnant est appelée potentiel de cavité (Hurwitz, 1978).

¹⁰ Le potentiel de self-atmosphère tient compte de la perturbation du potentiel moyen suite à la modification de la distribution de charges dans la couche diffuse par le nuage ionique d'un ion donné. Il tient compte autrement dit de la différence entre le potentiel causé par une distribution moyennée de charges dans la couche diffuse lorsqu'un ion est fixe à une position x et le potentiel provenant d'une distribution où aucun ion n'a de statut particulier (Hurwitz, 1978).

¹¹ Les ions et les molécules de solvant se polarisent en passant du coeur de phase, où le champ électrique est nul, à la couche diffuse, où le champ électrique devient très important (Barlow, 1970).

charges de surface sur les profils de potentiel, iv) les travaux de l'équipe de Cevc (voir Cevc & Marsh, 1987, chapitre 5) sur l'influence de la structuration du liquide (longueur des corrélations de la polarisation orientationnelle des molécules d'eau et forces d'hydratation), v) les articles de Zuckermann, Georgallas & Pink (1985) et de Frahm & Diekmann (1979) sur la variation de la permittivité relative dans la double couche, vi) l'article de Frahm & Diekmann (1979) et de Spitzer (1983) sur l'effet de volume des ions et celui de Carnie & McLaughlin (1983) où les auteurs traitent le cas de contre-ions divalents de grande dimension, vii) l'article de Gur, Ravina & Babchin (1978) où furent considérés les forces d'hydratation et le phénomène de saturation diélectrique ¹², celui de Cevc & Marsh (1983) tenant compte simultanément, mais sans couplage des termes correctifs, d'une distribution de charges en dehors du plan, d'une variation de la permittivité avec la concentration, des potentiels de self-atmosphère, des forces images et des forces d'hydratation, et celui de Levine & Bell (1966) traitant des effets de cavité, de self-atmosphère, de restriction volumique, de la saturation diélectrique, des forces images, de la polarisation ionique, et de l'électrostriction du solvant.

La pénétration des contre-ions en-deçà du plan chargé (limitation viii) est généralement tenue en ligne de compte dans les études où les charges de surface ne sont pas (Lyklema, 1968) - ou supposées ne pas être (Cevc, Svetina & Zeks, 1981) - réparties sur un plan. Les théories traitant explicitement de ces cas sont appelées théories des doubles couches poreuses («porous double layer theories»). Ces théories sont mises à contribution lorsqu'il est question de solution de polyélectrolytes (polymères, protéines, etc.) ou de membranes artificielles. Quant à l'adsorption spécifique (limitation ix), elle fait spécifiquement l'objet des prochaines sections.

Ouf ! Que tirer de toutes ces études ? Certes que la situation est compliquée (d'ailleurs sauf très rares exceptions, il n'y est pas question d'électrolytes asymétriques et encore moins de mélange d'électrolytes) et loin d'être résolue. Tentons quand même d'extraire quelques données générales: 1) selon la force ionique et la densité surfacique certaines corrections prennent le pas sur d'autres; 2) les diverses corrections pouvant affecter le

¹² Dans la littérature anglo-saxonne, le terme « dielectric saturation » réfère à la diminution de la permittivité relative suite à l'augmentation du champ électrique. Le phénomène précède donc l'état de saturation proprement dit, c.-à-d. lorsque la polarisation du diélectrique ne varie plus avec l'accroissement ultérieur du champ électrique (Sivoukhine (1983), p.157).

potentiel dans les deux sens, il n'est pas rare que certaines d'entre elles s'annulent ou se compensent partiellement; 3) les corrections tenant compte du volume ionique, des effets de self-atmosphère et de la saturation diélectrique semblent plus importantes que celles tenant compte de l'électrostriction et de la polarisation ionique; 4) à des concentrations d'ions monovalents supérieures à environ 30 mM et pour des valeurs de $|\psi(0)|$ supérieures à 100 mV, la théorie de Gouy-Chapman "faiblit" dangereusement.

Notons que ces résultats furent obtenus en modifiant "légèrement", via le potentiel de force moyenne, l'équation de Poisson-Boltzmann. Comme dit précédemment, cette approche ne fait pas l'unanimité. Certains y voient un raboutage de mauvais goût et préfèrent reconsidérer le problème d'une manière plus rigoureuse. Stillinger et Kirkwood, en 1960, furent les premiers, mécanique statistique en main, à élaborer une théorie "consistante" de la couche électrique diffuse. Depuis, une foule de chercheurs ont suivi cette voie. Mais vu la complexité de la tâche - l'état liquide ne se laisse point facilement théoriser ! - nous nous retrouvons aujourd'hui avec une foule de modèles (et de prédictions), et à moins d'être spécialiste il est difficile d'y voir clair (pour une revue de ces théories voir Henderson, 1983). Nous retenons quand même trois choses de ces études : 1) à des concentrations ioniques intermédiaires (10-100 mM), les prédictions des modèles "statistiques" ne diffèrent pas significativement de celles de la théorie de Gouy-Chapman; 2) les résultats des simulations à la Monte Carlo servent de plus en plus de standards en ce qui a trait aux prédictions des théories statistiques (voir p.ex. Outhwaite & Bhuiyan, 1983), et 3) les profils de concentrations et de potentiels obtenus à l'aide des modèles "statistiques" peuvent être de nature oscillatoire (contrairement à ce que prévoit la théorie de Gouy-Chapman).

2.1.1.5 De la couche diffuse de Gouy et Chapman...

Très tôt, les chercheurs s'aperçurent que la théorie de Gouy-Chapman pouvait donner des résultats à la limite aberrants. Prenons l'exemple d'une surface dont la densité superficielle de charge est égale à une charge élémentaire négative par $0,7 \text{ nm}^2$ (surface correspondant à l'aire moyenne occupée par un phospholipide dans une membrane) immergée dans une solution électrolytique constituée d'un seul sel ($i = 1$) de type 1:1 ($Z = \pm 1$), à une concentration de 100 mM ($C_{i\infty}$). Avec $T = 23^\circ\text{C}$ et $\epsilon_w = 78$, la théorie prédit une valeur de potentiel à la surface de -128,9 mV, ce qui correspond à 5,05 kT d'énergie. La théorie

prédit aussi (équation 2.11) une valeur du champ électrique à la surface de $-3,31 \cdot 10^8 \text{ V}\cdot\text{m}^{-1}$ et une valeur de la concentration interfaciale des contre-ions (équation 2.5) de 15,6 M, valeur plus spectaculaire encore. En effet, si nous entassions une couche d'ions K^+ ($r_i = 0,133 \text{ nm}$) jusqu'à ce qu'ils se touchent, nous obtiendrions une valeur de 102 M. Le même calcul avec des ions K^+ normalement hydratés ($r_i = 0,33 \text{ nm}$) donne 6,7 M. Une concentration de 15,6 M : cela laisse peu d'espace pour les co-ions et les molécules de solvant... et quelle répulsion électrostatique entre les contre-ions !

Ces petits calculs ont aussi l'avantage de bien montrer le milieu particulier - extrême ! - qu'est celui existant au voisinage d'une surface chargée. Vu sa petitesse ¹³, la couche diffuse se révèle donc un milieu hautement inhomogène: près de la surface, milieu compact et anisotrope; quelque nanomètres plus loin, milieu "clairsemé" et isotrope.

2.1.1.6 ... à la théorie de Gouy-Chapman-Stern.

En 1924, Otto Stern étendit la théorie de Gouy-Chapman afin de tenir compte de la dimension des ions près de la surface et de l'adsorption spécifique de ceux-ci sur la surface chargée. Il définit tout d'abord un plan de moindre approche en-deçà duquel les ions ne peuvent s'approcher, le plan de Stern (auquel on relie les plans interne et externe de Helmholtz, correspondant respectivement au plan de moindre approche des ions spécifiquement adsorbés, nécessairement déshydratés, et des ions non spécifiquement adsorbés, en général hydratés ¹⁴) et à ce plan il associa un potentiel ψ_δ , le potentiel de Stern, différent du potentiel à la surface, $\psi(0)$. La double couche électrique se divise donc, selon Stern, en deux régions : une couche interne où des ions peuvent s'adsorber et une couche diffuse (extérieure) obéissant à la théorie de Gouy-Chapman.

¹³ Rappelons qu'à une force ionique de 100 mM, la couche diffuse ne s'étend que sur 5 nm tout au plus (équation 2.9). Si nous calculons le volume de la couche diffuse autour d'une cellule sphérique de 1 μm de diamètre, nous arrivons à un faramineux volume de 16 aL, ce qui représente tout de même le 33^e du volume intracellulaire.

¹⁴ La définition des plans de Helmholtz varie selon les auteurs, certains préférant distinguer les plans de moindre approche des co-ions et des contre-ions dominants. Cette définition a l'avantage de ne pas faire intervenir le caractère spécifique de l'adsorption, caractère lui-même mal défini.

Quant à l'adsorption proprement dite des ions, Stern utilisa le formalisme développé par Langmuir quelques années auparavant. L'équation de Stern (voir formulations dans Wiese & coll., 1976, p. 100; Aveyard & Haydon, 1973, p. 49) fait appel pour chaque espèce ionique adsorbée à deux nouvelles variables : le nombre de sites d'adsorption disponibles et le potentiel d'adsorption spécifique. Ce potentiel d'adsorption tient compte de toutes les interactions non coulombiennes entre les ions adsorbés (adions) et la surface, entre les adions eux-mêmes, et entre les adions et les molécules d'eau (forces de solvation). Ce potentiel demeure le même, que la surface soit chargée ou non. (Remarquons encore ici le caractère trompeur de la notion d'un plan de Stern. En fait, c'est à chaque ion ou molécule chargée susceptible d'être adsorbée qu'il faut associer un plan de Stern, et même deux, les plans de Helmholtz, si nous tenons compte de l'état de solvation.)

2.1.1.7 Théorie de Gouy-Chapman-Stern. Généralités.

Les corrections telles qu'amenées par Stern ne furent, sauf exceptions (Davies & Rideal, 1961; Minging & Pethica, 1961), que peu utilisées. Probablement parce qu'elles nécessitent l'introduction de variables supplémentaires rendant la confrontation entre prédictions théoriques et données expérimentales plus difficile encore qu'elle ne l'est déjà. Et lorsque cela s'est avéré possible, les chercheurs ne purent déterminer des potentiels d'adsorption indépendants de la charge surfacique, même en tenant compte du déplacement latéral des charges de surface et des effets de charges discrètes ! Peu se sont obstinés et cela explique pourquoi l'on parle maintenant couramment de théorie de Gouy-Chapman-Stern sans qu'intervienne les distances de moindre approche ou encore les potentiels d'adsorption spécifique.

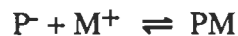
La théorie de Gouy-Chapman-Stern telle qu'utilisée aujourd'hui rend compte d'une adsorption de type Langmuir où l'on retrouve des constantes d'adsorption ion-surface (plutôt que gaz-surface) et où les concentrations ioniques jouent le rôle des pressions des gaz. Notons que ces concentrations ioniques ne sont pas celles du coeur de phase mais celles existant à la surface, concentrations dépendant donc du potentiel à la surface. Mais ne venons-nous pas de dire que les concentrations interfaciales prédites par la théorie de Gouy-Chapman étaient erronées ? Oui, sauf qu'ici ces hautes concentrations surfaciques seront difficiles à obtenir du fait qu'au fur et à mesure que les contre-ions (très nombreux) s'adsorberont à la surface, la charge nette surfacique diminuera, en valeur absolue,

entraînant une valeur plus faible du potentiel à la surface, en valeur absolue, et conséquemment de la concentration de contre-ions s'y trouvant. La théorie de Gouy-Chapman-Stern possède, vu son degré de liberté supplémentaire (l'adsorption), un caractère d'auto-régulation... Jusqu'à un certain point car il est possible, dans le cas d'une forte adsorption d'un contre-ion, que la charge surfacique diminue jusqu'à zéro puis change de signe lorsque le nombre de contre-ions adsorbés excède le nombre de charges à la surface. L'adsorption est dite alors "superéquivalente" (voir **figure 2.2e**).

Terminons en signalant que la théorie de Gouy-Chapman-Stern élargit drôlement le champ d'application de la théorie de Gouy-Chapman. En effet, si la théorie de Gouy-Chapman réclamait la présence d'une surface chargée, celle de Gouy-Chapman-Stern s'applique à toute surface chargée ou du moins susceptible (suite à l'adsorption d'espèces chargées) de le devenir.

2.1.1.8 Théorie de Gouy-Chapman-Stern

Soit l'adsorption d'un cation M^+ sur un site anionique à la surface P^- :



La constante d'adsorption est donnée en première approximation par la loi d'action de masse :

$$K_m = \frac{\{PM\}}{\{P^-\} C_m(0)}$$

- K_m : constante d'adsorption du cation M sur le site P^- (M^{-1})
- $\{PM\}$: concentration à la surface de sites "neutralisés" (m^{-2})
- $\{P^-\}$: concentration à la surface de sites vacants (m^{-2})
- $C_m(0)$: concentration à la surface de contre-ions (M)

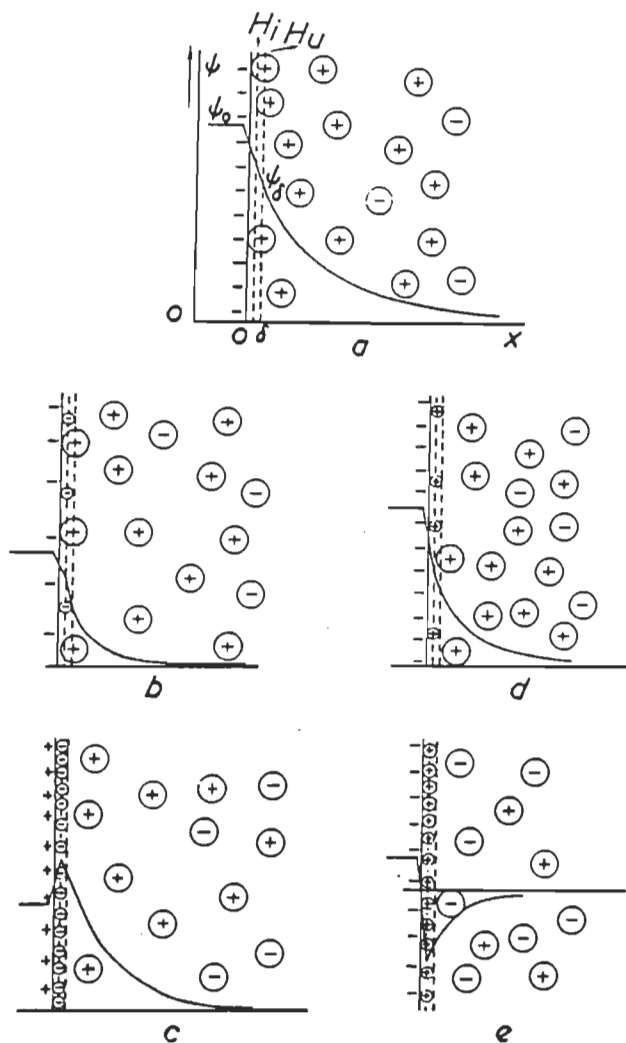


FIG. 5. Distribution of ions and potential in the double layer according to Grahame (18). a. No specific adsorption. b. Specific adsorption of anions. c. Strong specific adsorption of anions. d. Specific adsorption of cations. e. Strong specific adsorption of cations.

Figure 2.2. – Effet de l'adsorption ionique spécifique sur le profil du potentiel électrostatique. (Tiré de Overbeek & Lijklema, 1959).

Avec $\{P\} = \{PM\} + \{P^-\}$ la concentration interfaciale de sites, nous pouvons exprimer la densité de charges comme étant égale à :

$$\sigma = \{P^-\} = \frac{\{P\}}{[1 + K_m C_m(0)]}$$

$\{P\}$: concentration totale de sites à la surface (m^{-2})

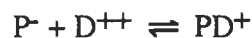
σ : densité de charge superficielle nette (m^{-2})¹⁵

L'inverse de la constante d'adsorption correspond donc à la concentration ionique pour laquelle la moitié des sites seront couverts. Plus la constante d'adsorption est élevée, moindre est la concentration nécessaire pour remplir la moitié des sites. La constante d'adsorption peut être considérée comme une constante d'affinité de l'ion pour le site.

Si plusieurs cations univalents s'adsorbent, chacun avec une constante d'adsorption donnée, et toujours dans un rapport 1:1 (un ion s'adsorbe sur un site), nous obtenons, dans le cas d'une adsorption compétitive :

$$\sigma = \{P^-\} = \frac{\{P\}}{\left[1 + \sum_{m=1}^r \left(\frac{K_m C_m(0)}{1 + K_m C_m(0)} \right) \right]}$$

Si des cations divalents présents en solution compétitionnent avec des cations monovalents nous aurons, outre l'adsorption donnée plus haut :



avec:

$$K_d = \frac{\{PD^+\}}{\{P^-\} C_d(0)}$$

¹⁵ Pour obtenir σ en $C \cdot m^{-2}$ (unités SI) il suffit de multiplier le membre de gauche par la charge élémentaire ($= 0,160\,218\,9 \text{ aC}$).

ce qui conduit à une densité superficielle de charges égale à :

$$\sigma = \{P^-\} - \{PD^+\} = \{P\} \left[\frac{1 - \sum_{d=1}^s K_d C_d (0)}{1 + \sum_{d=1}^s K_d C_d (0) + \sum_{m=1}^r K_m C_m (0)} \right] \quad [2.13]$$

Nous pouvons complexifier encore si l'on suppose une adsorption de cations divalents sur des sites neutres (sites neutralisés ou autres sites neutres) (McLaughlin et coll., 1981); si l'on suppose l'adsorption d'ions divalents dans un rapport 1:2 ($P^- + D^{++} + P^- \rightleftharpoons PDP$) (Amory & Dufey, 1985) ; si l'on suppose l'adsorption simultanée d'ions mono-, di- et trivalents sur des sites anioniques et avec stoechiométrie variable (Bentz & Nir, 1980); si l'on suppose encore une topologie particulière des sites (Cohen & Cohen, 1981).

2.1.1.9 Ionisation à la surface et sites d'adsorption

Jusqu'ici nous avons supposé que les sites d'adsorption étaient tous chargés. Qu'advient-il si la surface contient, et c'est le cas qui nous préoccupe, des groupements susceptibles d'être protonés ? Evidemment, la charge nette sera dépendante du pH, plus précisément du pH à la surface. Une variation de pH, via une modification du potentiel à la surface, entraînera une variation de la quantité de contre-ions adsorbés. Et inversement, la courbe de titration des groupements ionisables se déplacera selon les concentrations ioniques de la solution (de la quantité d'ions adsorbés donc). Qualitativement, cela est clair. Quantitativement... comment modifierons-nous le modèle de Gouy-Chapman-Stern pour tenir compte de l'état d'ionisation de la surface ?

L'équation de Henderson-Hasselbach permet de calculer, à un pH donné, le pourcentage des sites qui sont protonés. Si nous connaissons le pKa des groupements à la surface, l'équation nous fournit donc l'état d'ionisation de la surface. Mieux encore: l'équation de Henderson-Hasselbach est formellement identique à celle de Langmuir; la constante d'adsorption de H^+ étant simplement l'inverse de la constante d'acidité. Il serait donc naturel d'utiliser l'équation 2.13 en ajoutant un terme à la sommation pour tenir compte des protons compétitionnant avec les autres cations. Mais est-ce vraiment si naturel ? Le proton

peut-il être considéré au même titre que d'autres cations tels le Na^+ et le K^+ ? La différence est-elle "seulement" de taille ? Les constantes d'adsorption du proton (et les énergies associées) sont en général des ordres de grandeur plus élevées que celles des autres cations... S'agit-il vraiment d'adsorption ? Une différence quantitative ou un phénomène qualitativement différent ? Chimisorption ou physisorption ? Dissociation acide ou désorption ? La question n'est pas anodine, ni de nature purement académique puisque les densités de charges et les potentiels à la surface prédits peuvent différer notablement selon que l'on distingue ou non la protonation de l'adsorption (notes personnelles). Protonation suivie d'adsorption ou adsorption compétitive (ou non !) entre cations et protons ?

Du côté des théoriciens, Cohen & Cohen (1981) proposèrent de corriger, au départ, la densité de charge maximale à l'aide de l'équation de Henderson-Hasselbach (ionisation puis adsorption, donc) alors que Copeland & Andersen (1981a,b), élaborèrent un modèle, mécanique statistique en main, traitant de l'adsorption compétitive entre protons et cations divalents.

Du côté des biologistes expérimentalistes, différents modèles furent utilisés: ionisation d'un groupement ionisable sans adsorption (Barber & Searle, 1979), ionisation d'un groupe ionisable suivie d'une adsorption d'ions divalents (Godt, 1981; Kostyuk & coll., 1982), adsorption compétitive sur un même site entre protons et cations monovalents (Bell, 1985; Rauch & coll., 1990), entre protons et cations divalents (Krafte & Kass, 1988), entre protons, cations mono- et divalents (Ohki & Kurland, 1981), et finalement adsorption compétitive sur plusieurs sites entre protons et ions divalents (Hille & coll., 1975; Krafte & Kass, 1988).

Une étude de Puskin & Coene (1980), sur des vésicules de PS, semble démontrer une déprotonation directe du lipide par les ions Mn^{++} . Cette dernière étude pourrait accréditer la thèse d'une adsorption compétitive plutôt que celle d'une protonation indépendante de toute adsorption ionique, si elle était plus concluante toutefois. Le problème demeure donc entier ¹⁶.

¹⁶ Un problème similaire est rencontré par les physicochimistes des colloïdes. Il s'agit de l'adsorption ionique pH-dépendante à l'interface oxyde-électrolyte. Des modèles de Gouy-Chapman-Stern avec groupements ionisables, la majorité des chercheurs passèrent aux modèles à site de fixation selon lesquels la surface est traitée comme un réseau bidimensionnel de sites acido-basiques (chargés ou non) pouvant fixer,

2.1.1.10 Mise en oeuvre de la théorie de Gouy-Chapman-Stern

Aux paragraphes précédents, nous avons pu exprimer la densité de charge nette en fonction des constantes d'adsorption et des concentrations interfaciales. En combinant cette équation avec celle de Grahame puis en remplaçant les concentrations surfaciques à l'aide de l'équation de Boltzmann nous obtenons l'équation maîtresse de la théorie de Gouy-Chapman-Stern (ici pour un sel Z-Z) :

$$\{P\}^2 \left[\frac{1 - \sum_{d=1}^s K_d C_d(0)}{1 + \sum_{d=1}^s K_d C_d(0) + \sum_{m=1}^r K_m C_m(0)} \right]^2 = 2 \varepsilon_0 \varepsilon_w RT \sum_{i=1}^n \{C_i(0) - C_i(\infty)\} \quad [2.14]$$

avec

$$C_{i,m,d}(0) = C_{i,m,d}(\infty) \exp \left(\frac{-Z_{i,m,d} \mathfrak{I} \psi(0)}{RT} \right)$$

Pour résoudre cette équation, on ramène tous les termes d'un côté, et l'on trouve par un procédé itératif le zéro de l'équation (l'équation étant transcendante, nous ne pouvons la résoudre analytiquement). Ceci bien sûr, si l'on connaît toutes les variables sauf une. Si l'on désire déterminer les différentes variables (σ , $\psi(0)$, K_M , K_D) à partir d'un ensemble de données, nous devons utiliser, de concert avec l'algorithme de recherche de zéros, un algorithme d'approximation de fonctions telle la méthode du simplexe (Caceci & Cachieris, 1984). Notons ici que pour une modélisation un tant soit peu compliquée, plusieurs "vecteurs-solutions" peuvent "répondre" d'aussi belle façon à un ensemble de données.

2.1.1.11 Limitations de la théorie de Gouy-Chapman-Stern

Outre les difficultés propres à la modélisation, la théorie de Gouy-Chapman-Stern souffre de nombreuses limitations, même dans sa forme générale. Ainsi nous considérons la

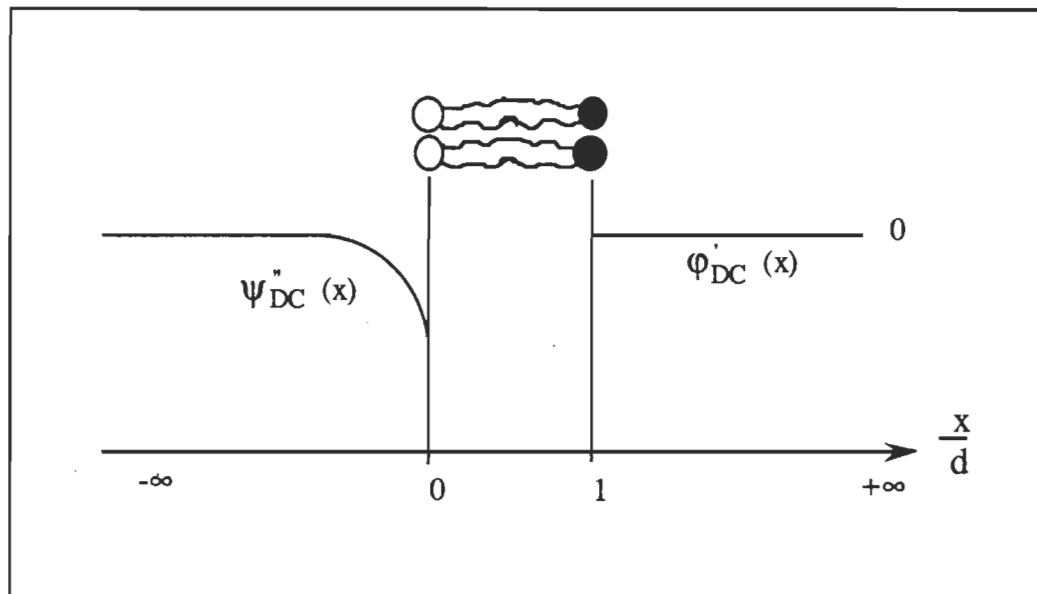
suivant une série de réactions, ions et protons (Davis & coll., 1978). Ces modèles peuvent expliquer un plus grand nombre de résultats expérimentaux, mais selon bon nombre de chercheurs leur validité n'est pas vraiment démontrée.

surface d'adsorption i) comme un plan équipotentiel (ignorant ainsi les effets de charges discrètes); ii) nous posons une constante d'adsorption qui ne dépend, pour une surface donnée, que de l'espèce adsorbée (et non pas de sa concentration ou encore de la température ou de tout autre facteur); et iii) nous supposons, lors ou après adsorption, aucune altération physique ou chimique de la surface (même densité, même compressibilité volumique, même réactivité). Sans oublier les limitations propres à la théorie de Gouy-Chapman, limitations dont la plupart prennent ici une importance plus grande (le phénomène d'adsorption se produisant - et c'est un euphémisme - très près de l'interface chargée). De nombreuses tentatives visant à étendre le champ de validité de la théorie virent le jour. Peu d'entre elles se sont avérées marquantes. Et de celles-ci rares sont celles qui peuvent être appliquées aux interfaces "biologiques". Sur ce front, biologique, certains chercheurs (Ohki & Kurland, 1981; Coronado & Affolter, 1986; Gambale, Menini & Rauch, 1987) substituèrent les activités aux concentrations, sans trop de conviction toutefois... Du côté des physicochimistes, les revues de Wiese & coll. (1976), Habib & Bockris (1980) et Reeves (1980) peuvent être recommandées. Outre de reconnaître la complexité de la tâche, le lecteur saisira bien l'importance de scinder la double couche en une région dite interne (ou compacte) et une région externe, diffuse.

2.1.1.12 Profil intramembranaire du potentiel dû aux doubles couches

Supposons que nous ayons maintenant une bicouche formée de PE ou PC (neutres) d'un côté et de PG ou PS (chargés négativement) de l'autre côté. Si les phases aqueuses bordant la bicouche sont constituées d'une solution de KCl 100 mM, nous aurons du côté neutre un potentiel de Gouy à la surface de 0 mV alors que du côté PS nous aurons en utilisant l'équation 2.14 un potentiel de l'ordre de -100 mV (avec $T = 23^{\circ}\text{C}$, $\epsilon_w = 78$, $\sigma = -1 / 0,7 \text{ nm}^2$ et $K_M = 0,2 \text{ M}^{-1}$), une valeur de 25 % inférieure à ce que nous obtenions sans tenir compte de l'adsorption des ions K^+ . Mais ce qui importe ici, c'est que nous ayons, dans des conditions symétriques de concentrations ioniques, une différence de potentiel transmembranaire, $\Delta\psi_{\text{DC}}$, égale à 100 mV et un champ électrique au sein de la bicouche de l'ordre de $20 \times 10^6 \text{ V}\cdot\text{m}^{-1}$! Mais avons-nous bien un tel champ dans la bicouche ? En fait, la véritable question est la suivante: quel est le profil du potentiel et du champ électrique dans la bicouche ? Ici encore nous devons utiliser la loi de Poisson et intégrer deux fois pour obtenir le potentiel. Un calcul simple nous montre que pour une densité de charges moyenne dans la membrane inférieure à $10^4 \text{ C}\cdot\text{m}^{-3}$, le champ électrique

est relativement constant dans la bicouche. Mais est-ce bien le cas dans la situation qui nous préoccupe ? ¹⁷ Walz & coll. en 1969 ont comparé la concentration de charge limite à la concentration maximum de charges que nous retrouverions dans une membrane de grande perméabilité ionique. Ils ont trouvé un rapport indiquant que l'on pouvait avec assurance considérer le champ comme étant constant dans la membrane (tel qu'illustré à la figure qui suit).



Mais comme le font remarquer Attwell & Jack (1978), il est possible que la concentration de charges à un endroit donné de la membrane excède la concentration limite et distorde le champ électrique. En absence de preuves expérimentales en ce sens nous considérerons l'approximation du champ constant valide et l'expression du potentiel au travers de la membrane sera ainsi donnée par l'équation 2.15:

¹⁷ Pour une bicouche de 250 μm de diamètre cette densité correspond à un nombre de charges de 1,5 million.

$$\psi_{DC}(x) = \left(\psi'_{DC}(d) - \psi''_{DC}(0) \right) \cdot \frac{x}{d} + \psi''_{DC}(0) \quad [2.15]$$

- $\psi_{DC}(x)$: potentiel à une distance x à l'intérieur de la membrane dû à la présence des doubles couches électriques (mV)
 $\psi'_{DC}(d)$: potentiel de Gouy à la surface du côté droit à $x = d$ (mV)
 $\psi''_{DC}(0)$: potentiel de Gouy à la surface du côté gauche à $x = 0$ (mV)

avec $\psi''_{DC}(0)$ et $\psi'_{DC}(d)$ déterminés à l'aide de l'équation 2.14. Nous retrouvons à la **figure 2.3** une représentation typique, avec données numériques, du potentiel dû aux doubles couches électriques. Il est représenté en A une membrane symétrique chargée négativement alors que nous retrouvons en B une membrane possédant une asymétrie de charge. Les solutions salines étant identiques de part et d'autre de la membrane, nous avons une différence de potentiel transmembranaire nulle en A mais d'environ 25 mV en B.

Mais vu la faible épaisseur de la membrane, les charges superficielles situées d'un côté de la membrane ne devraient-elles pas affecter celles situées de l'autre côté ? Nelson, Colonomos & McQuarrie (1975) effectuèrent une étude théorique sur le couplage électrostatique susceptible de se produire entre les charges de surface - et leur couche diffuse - situées de part et d'autre d'une bicouche. Leurs résultats indiquent que ce couplage dépend principalement du rapport ϵ_w / ϵ_M et de la différence des potentiels électrostatiques à la surface. Si l'on prend un rapport des permittivités relatives d'environ 30, un potentiel transmembranaire de l'ordre de 80 mV (une valeur typique) et une distance entre les plans de charges de 5 nm, l'erreur commise sur l'évaluation du potentiel transmembranaire serait d'environ 2%. Ces effets de couplage étant petits, nous conserverons l'expression du potentiel donnée par l'équation 2.15.

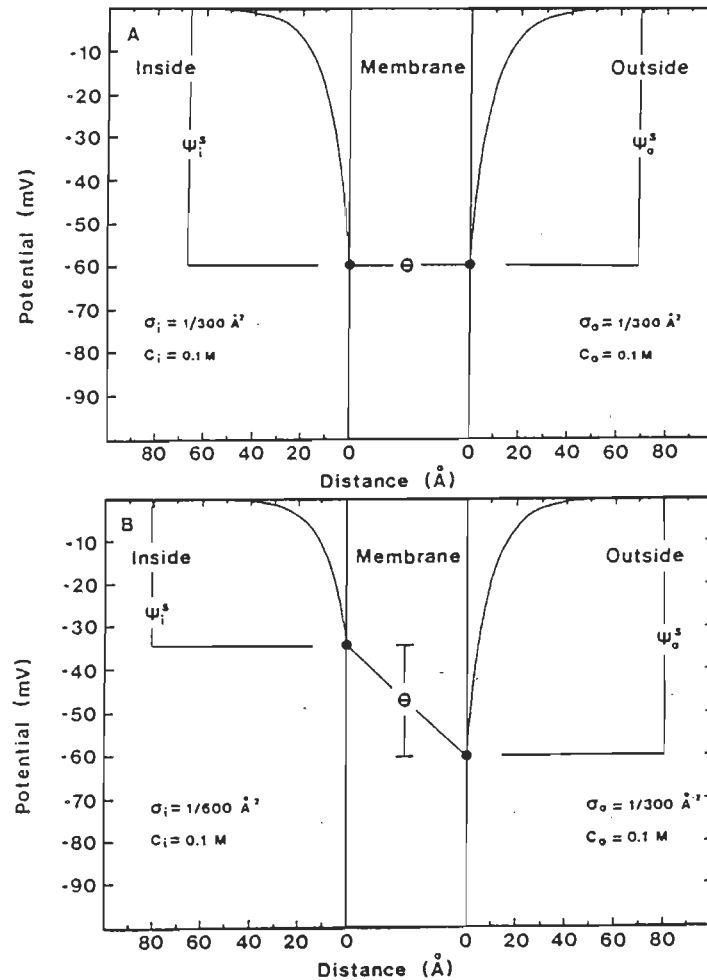


Fig. 2-1. Interrelation between surface and transmembrane potential. The figure is a schematic presentation of the electric potential profile in the vicinity of a phospholipid bilayer as predicted by the Gouy-Chapman theory. It also demonstrates the predicted effect of surface charge density, ion concentration, and bulk transmembrane electrical potential on the electric field experienced by the membrane. ψ_i^s and ψ_o^s are the potentials at the inside and outside surfaces, respectively. C_i and C_o are the bulk salt concentrations of the inside and outside solutions, respectively. σ_i and σ_o are the surface charge densities in negative charges/Å² of the inside and outside, respectively. $\Delta\psi$ is the potential difference between the inside and outside bulk solution (outside negative). θ is the potential difference between the two membrane-solution interfaces. The figure is drawn to scale with a bilayer thickness of 50 Å. A: The surface charge densities and bulk ion concentrations are the same on both sides of the bilayer. B: The same conditions as in A, except for a decrease in surface charge density of the inside surface.

Figure 2.3. – Illustration en B d'un potentiel transmembranaire créé par une asymétrie des doubles couches électriques. La densité de charge surfacique (σ) sur la face gauche de la membrane type est de deux fois inférieure à celle du côté droit. Les coeurs de phase de chaque côté de la membrane sont identiques. (Tiré de Clementz & coll., 1988).

2.1.2 Potentiel dipolaire

2.1.2.1 Généralités

Bien que pendant nombre d'années des potentiels interfaciaux de plusieurs centaines de mV aient été mesurés sur des films monomoléculaires de lipides zwitterioniques ou neutres, on ne savait pas trop d'où originaient ces potentiels. La preuve en est que pendant longtemps, dans les études portant sur des bicouches planes et des liposomes, ou encore sur des membranes naturelles - toutes structures montrant pourtant deux interfaces huile-eau - , nulle mention n'était faite de ces potentiels interfaciaux. À la fin des années '60, l'équipe de Topaly & Liberman effectua une série de travaux sur la conductance de films bilipidiques noirs en présence de cations et d'anions liposolubles chimiquement similaires. Il fut trouvé que la perméabilité des anions était environ 10^4 fois plus grande que celle de leurs analogues cationiques. Les auteurs conclurent que tout se passait comme si l'intérieur de la bicouche se trouvait à un potentiel de + 150 mV relativement à l'extérieur (Liberman & Topaly, 1969). Leurs travaux, comme beaucoup de ceux de leurs compatriotes, demeurèrent dans l'oubli. Il a fallu attendre la revue de Haydon & Hladky en 1972 pour relancer le débat autour de ces potentiels "intérieurs". Pour la première fois, une distinction bien nette fut apportée entre potentiel de la double couche et ce qui fut par la suite appelé potentiel dipolaire (« dipole or dipolar potential »). Plusieurs équipes utilisèrent au cours des années suivantes ce nouveau concept, avec un réel profit. Citons les travaux de Hladky & Haydon (1973), McLaughlin (1973), Szabo (1974, 1976), Andersen & Fuchs (1975), Latorre & Hall (1976), et plus près de nous, Thompson & Krull (1983). Notons que tous ces auteurs sont des artisans des BLM. Ce n'est que lentement et laborieusement que l'idée d'un potentiel dipolaire positif à l'intérieur de la membrane a fait son chemin dans l'esprit des biologistes et des membranologues. De 1965 à 1985, environ 110 articles portèrent sur ce sujet. Cela est bien peu en regard de l'importance de ce potentiel, qui peut atteindre, répétons-le, plusieurs centaines de millivolts.

2.1.2.2 Origine du potentiel dipolaire

Dans un précédent travail (Brullemans, 1987), nous assimilons les molécules se retrouvant à l'interface entre deux phases de composition différente à des tirailleurs tirillés au front. Bien que cette vision souffre d'un anthropomorphisme flagrant, il n'en demeure pas moins

que les molécules interfaciales subissent, dû à l'asymétrie des forces s'exerçant sur elles, de fortes contraintes. Une manière plus douce de voir les choses consiste à considérer ces molécules comme autant de diplomates tentant de réduire les tensions à la frontière. Pour y arriver, les molécules-diplomates s'entassent et s'orientent à l'interface de manière à rendre la transition la plus graduelle possible (à élargir la frontière en quelque sorte). Cette organisation (ou réorganisation) des molécules à l'interface se traduit par une tension interfaciale et si la molécule possède un moment dipolaire, permanent ou non, par un potentiel interfacial paramètres tous deux mesurables expérimentalement. Bien qu'il ne fasse aucun doute que la grandeur de ces paramètres reflète la grandeur des forces entre les molécules et leur degré d'orientation, il n'existe pas à l'heure actuelle de théorie, même qualitative, qui permette de relier de manière vraiment satisfaisante paramètres moléculaires et données macroscopiques.

Prenons le cas d'une interface exempte de charges libres (sans potentiel de Gouy donc). Prenons l'interface eau-vapeur d'eau. Interface bien connue... Eh bien non ! Comme le soulignent dans un article récent Matsumoto & Kataoka (1988), nous ne savons même pas quelle est la nature des forces présidant à l'orientation des molécules d'eau à l'interface. La présence de liens hydrogène semble importante mais encore... Des résultats de simulations numériques (basées sur une méthode de dynamique moléculaire et un modèle de l'eau dit de Carravetta-Clementi) effectuées par ces mêmes auteurs, les suivants me semblent dignes d'intérêt : i) la région interfaciale s'étendrait sur environ 0,5 nm, ii) l'orientation des molécules d'eau à l'interface serait principalement déterminée par les termes de couplage dipôle-quadrupôle, iii) l'orientation des molécules du côté vapeur ne serait pas la même que celle du côté liquide, et iv) le potentiel interfacial prédit (dû à l'orientation des dipôles que constituent les molécules d'eau) est de -160 mV ¹⁸. Une récente évaluation utilisant le même modèle mais avec un calcul différent donne (Wilson, Pohorille & Pratt, 1989): +600 mV ! Et il existe une foule d'autres modèles pour l'eau liquide, et différentes méthodes de simulation... Autre ombre au tableau (ou serait-ce la même ?): les mesures du potentiel à l'interface eau-vapeur montrent d'aussi grands écarts. Les mesures les plus fiables aujourd'hui se situent entre -300 et +400 mV, avec une tendance vers -50 mV (Wilson, Pohorille & Pratt, 1988).

¹⁸ Le signe moins signifie que le potentiel dans la phase vapeur est plus petit que celui existant dans la phase liquide. Cela correspond dans le cas qui nous préoccupe à une orientation générale telle que les atomes d'oxygène se trouvent près de la phase vapeur et les atomes d'hydrogène plus à l'intérieur du liquide.

Les films monomoléculaires constituant une interface plus compliquée que celle dont il vient d'être question, nous devrions, logiquement, nous attendre au pire. Nous aurions tort car les données de ΔV , de l'ordre de +450 mV (pour des films de phospholipides zwitterioniques près du collapse), ne varient pas plus en général qu'une quinzaine de mV, ce qui représente un coefficient de variation d'environ 3%. Cette bonne reproductibilité des mesures de ΔV , et surtout le large éventail de molécules tensioactives sur lequel ces mesures ont été effectuées nous ont permis de cerner un peu l'origine du potentiel dipolaire. En ce qui concerne plus spécifiquement les films phospholipidiques, l'on s'entend sur quatre contributions principales (Simon & McIntosh, 1989): i) l'orientation des têtes polaires zwitterioniques, ii) l'orientation des groupes carbonyles en début de chaîne, iii) la réorientation des molécules d'eau à proximité des têtes polaires, et iv) l'orientation des groupements méthyles aux extrémités des chaînes aliphatiques. Les dipôles de bout de chaîne de chacun des feuilletts composant la bicouche se faisant face, cette dernière contribution est considérée négligeable en ce qui concerne le potentiel dipolaire des bicouches phospholipidiques¹⁹.

Soulignons encore que ces données furent fournies principalement suite aux études sur le potentiel à l'interface air-eau de films monomoléculaires. Mais ces mesures peuvent-elles être considérées fiables?

2.1.2.3 Aparté sur la mesure des potentiels à l'interface air-eau

Deux méthodes sont couramment utilisées pour mesurer le "potentiel de surface" de films monomoléculaires: celle de "l'électrode ionisante" datant de 1924 et celle du "condensateur vibrant" ou de la "plaque vibrante" datant de 1933. Venselaar & coll. (1979), après avoir théoriquement généralisé les deux approches, ont développé une troisième méthode (en fait un hybride parfait des deux autres), qu'ils ont dénommée méthode du "condensateur statique".

La méthode du condensateur vibrant consiste à communiquer un mouvement d'oscillation de haut en bas à un disque métallique (constituant une plaque du condensateur) placé tout près de l'interface

¹⁹ Certains auteurs tels Bechinger & Seelig (1991) croient toutefois que les dipôles des méthyles de bout de chaîne pourraient jouer un rôle important.

air-eau ²⁰ (l'autre plaque du condensateur) et à mesurer, à la fréquence d'oscillation, le courant produit par les variations de la capacité. En annulant ce courant à l'aide d'une tension externe, V_c , l'on mesure directement - paraît-il - le potentiel à l'interface, celui-ci étant égal à $-V_c$. Une deuxième électrode, impolarisable, est plongée dans la sous-phase afin de fermer le circuit.

La méthode de l'électrode ionisante, techniquement moins exigeante, est de loin la plus utilisée. L'extrémité de l'électrode ionisante est constituée d'un disque de métal noble serti d'une source radioactive (Am^{241} , Pu^{234}). L'électrode est placée à quelques millimètres de la surface, de telle manière que l'air entre l'électrode et la surface puisse être ionisé et rendu suffisamment conducteur pour qu'un contact électrique s'établisse. En mesurant la différence de potentiel entre l'électrode ionisante et l'électrode de référence plongée dans la phase aqueuse, l'on mesure directement - paraît-il - le "potentiel de surface".

Il existe une variante de la méthode de l'électrode ionisante où au lieu de retrouver une électrode ionisante dans l'air et une électrode de référence dans la phase aqueuse, nous avons deux électrodes ionisantes: l'une est située au-dessus du film lipidique et l'autre au-dessus d'une région de la surface exempte de lipides; et pas d'électrode dans la sous-phase (Plaisance & Ter-Minassian-Saraga, 1970). De cette manière nous avons directement une mesure différentielle du "potentiel de surface".

Dans un précédent travail (Brullemans, 1989), nous tentions de comprendre, à partir de considérations sur les potentiels de saut, de Galvani et de Volta, à quoi correspondaient vraiment ces mesures de potentiel à l'interface air-eau:

"Outre notre interface air-eau, nous retrouvons aussi une (ou deux) interface(s) air-métal et une (ou pas d') interface métal-solution. Sans oublier les différents potentiels de Volta entre les métaux constituant notre circuit de mesure. Comment s'en sortir ?... (...) Aveyard & Haydon (1973) reprennent le "raisonnement" de Parsons (1954) en tentant de rendre le tout (avec le danger que cela représente) plus accessible au lecteur. Voici les points essentiels du "raisonnement": i) les ions et les électrons ont le même potentiel électrochimique dans toutes les phases (situation d'équilibre), ii) la présence du film monomoléculaire à l'interface ne modifie pas notablement le potentiel chimique des différentes espèces dans les phases air et eau (prépondérance donc de la population moléculaire des coeurs de phase sur celle de l'interface), iii) la différence de différence de potentiel mesurée, ΔV , correspond à une différence de potentiel de Volta (!) et cette différence de potentiel origine probablement (de ii) d'une variation du potentiel de saut à l'interface. (...) Les analyses théoriques résumées ci-haut furent développées à partir des méthodes classiques de mesure de ΔV (une électrode

²⁰ L'interface air-eau est l'appellation consacrée, nous la garderons, en ayant toutefois en tête qu'il s'agit de l'interface entre une phase aqueuse, pouvant contenir ou non des électrolytes, et une phase gazeuse constituée d'un mélange d'air et de vapeur d'eau.

immergée et ΔV mesuré en appliquant un potentiel de compensation annulant le champ entre les électrodes). Aucune analyse concernant la méthode de l'électrode ionisante ne fut à notre connaissance publiée. Si l'on mesure directement ΔV , sans compenser, obtenons-nous la même valeur ? Autrement dit, l'hypothèse de Kelvin voulant que la différence des potentiels de saut ne dépende pas de la tension appliquée tient-elle ? Le ΔV mesuré par Tocanne et coll. correspond-il à une variation du potentiel de saut à l'interface ? Nous ne pouvons que laisser la question ouverte..." et plus loin (p.88) "Une théorie qu'il faudrait peut-être réexaminer."

Au mois de septembre 1991, Mozaffary, dans un article paru dans la revue *Chemistry and Physics of Lipids*, jette un pavé dans la mare. Utilisant une variante de la technique du condensateur vibrant, Mozaffary rapporte des données de ΔV pour des films monomoléculaires de PC légèrement plus élevées que les valeurs habituelles mais surtout... de signe contraire ! L'auteur fait valoir le fait que sa technique permet de mesurer plus directement la différence de potentiel de Volta à l'interface, sans faire intervenir la phase aqueuse (ce qui est en accord avec la définition du potentiel de Volta). Toujours selon l'auteur, l'ensemble des données positives de ΔV reportées dans la littérature depuis 1924 serait causé par le passage de protons ou de cations au travers de l'interface...

Retournons du côté des membranes bilipidiques. Des articles plus récents (Krull & coll., 1991; Bechinger & Seelig, 1991) ne remettent pas en cause les différentes contributions au potentiel dipolaire (d'ailleurs quelle autre contribution pourrait-on imaginer...). Le débat actuel tourne plutôt autour des liens possibles entre potentiel dipolaire et potentiel d'hydratation. Cevc & Marsh (1987) égalèrent le potentiel d'hydratation à la somme des différents moments dipolaires de la tête polaire alors que Simon & McIntosh (1989) ont carrément remplacé le potentiel d'hydratation par le potentiel dipolaire (lui-même posé égal au ΔV de films phospholipidiques non chargés !). Les deux équipes arrivent à des résultats intéressants mais Gawrisch & coll. (1990) font finement remarquer qu'il n'est pas clair que le potentiel dipolaire oriente les molécules d'eau avoisinantes. Le lien de causalité devrait selon eux être inversé.

2.1.2.4 Grandeur et conséquence du potentiel dipolaire

À partir des mesures de conductance des ions liposolubles tétraphénylborate (TPB⁻) et tétraphénylarsonium (TPAs⁺) au travers de films noirs, Andersen & Fuchs (1975) purent estimer le potentiel dipolaire au centre d'une bicouche de PE d'origine bactérienne à +310 mV. Pickar & Benz (1977) obtinrent pour leur part sur des films noirs de DOPE +215 mV. Plus récemment, Flewelling et Hubbell (1986a) obtinrent en combinant plusieurs

données $+240 \pm 70$ mV pour la PC d'oeuf. Le signe du potentiel dipolaire fait ici l'unanimité.

Retenons +250 mV comme valeur approximative de ψ_D pour une bicouche phospholipidique. C'est une valeur considérable. Un ion K^+ passant de la phase aqueuse au centre de la bicouche acquerra une énergie potentielle égale à +10 kT environ alors qu'un anion univalent verra son énergie décroître de la même quantité. Le potentiel dipolaire favorise donc le passage des anions et s'oppose à celui des cations. L'effet d'une variation de ψ_D sur la conductance anionique et cationique est symétrique: si l'une est multipliée par un facteur 10 000, l'autre est diminuée par le même facteur. Ce raisonnement ne tient toutefois que si le coefficient de partition et le coefficient de diffusion dans la membrane des anions et des cations demeurent inchangés où au mieux affectés de la même façon par la variation de ψ_D .

2.1.2.5 Modélisation du potentiel dipolaire

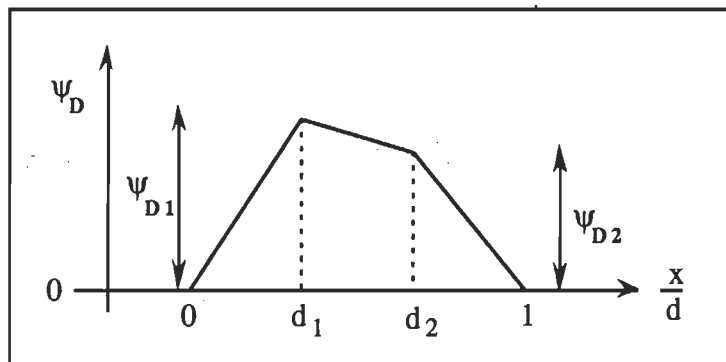
La molécule de phospholipide et les molécules d'eau qui lui sont associées sont habituellement représentées par un seul dipôle effectif situé grosso modo à la hauteur de la région acétyle. Considérons une membrane comprenant deux séries de dipôles alignés et dont l'intérieur serait à un potentiel positif. La membrane phospholipidique est évidemment représentée, selon ce modèle, par quatre plans de charges: respectivement négatives, positives, positives et négatives. Chaque couple de plans peut être ensuite assimilé à un condensateur plan. Selon l'équation de Helmholtz, la différence de potentiel entre les plaques est égale à :

$$\psi_D = \frac{Q}{C} = \frac{N q d}{A \epsilon_0 \epsilon_M} = \frac{n p}{\epsilon_0 \epsilon_M} \quad [2.16]$$

- ψ_D : différence de potentiel entre les plaques (V)
- Q : charge totale de la plaque (C)
- C : capacité du condensateur plan (F)
- N : nombre total de charges sur une plaque (= nombre de dipôles)
- q : charge électrique de chaque charge partielle (C)
- d : distance entre les plans de charges (m)
- A : surface de chaque plan (m^2)

- ϵ_M : permittivité relative du milieu diélectrique entre les plaques (–)
 n : densité superficielle des dipôles (m^{-2})
 p : composante perpendiculaire du moment dipolaire net ($C \cdot m$).

Selon le modèle du condensateur plan, nous avons, pour une membrane ne montrant pas d'asymétrie transversale, un profil de potentiel dipolaire trapézoïdal (voir **figure 2.4**) : ψ_D est égal à 0 à gauche de la première plaque, puis augmente linéairement (le champ à l'intérieur d'un condensateur plan étant constant) jusqu'à atteindre sa valeur maximale, ψ_D , au niveau de la plaque chargée positivement. Il demeure constant entre les plaques positives, et chute jusqu'à 0 au niveau du second plan de charges négatives. Dans le cas d'une bicouche lipidique asymétrique, nous aurions un trapèze asymétrique et dont la hauteur de chaque côté serait différente ²¹.



²¹ Nous n'avons plus à proprement parler un trapèze mais pour des raisons de commodité nous garderons, comme la majorité des chercheurs, la dénomination trapèze asymétrique.

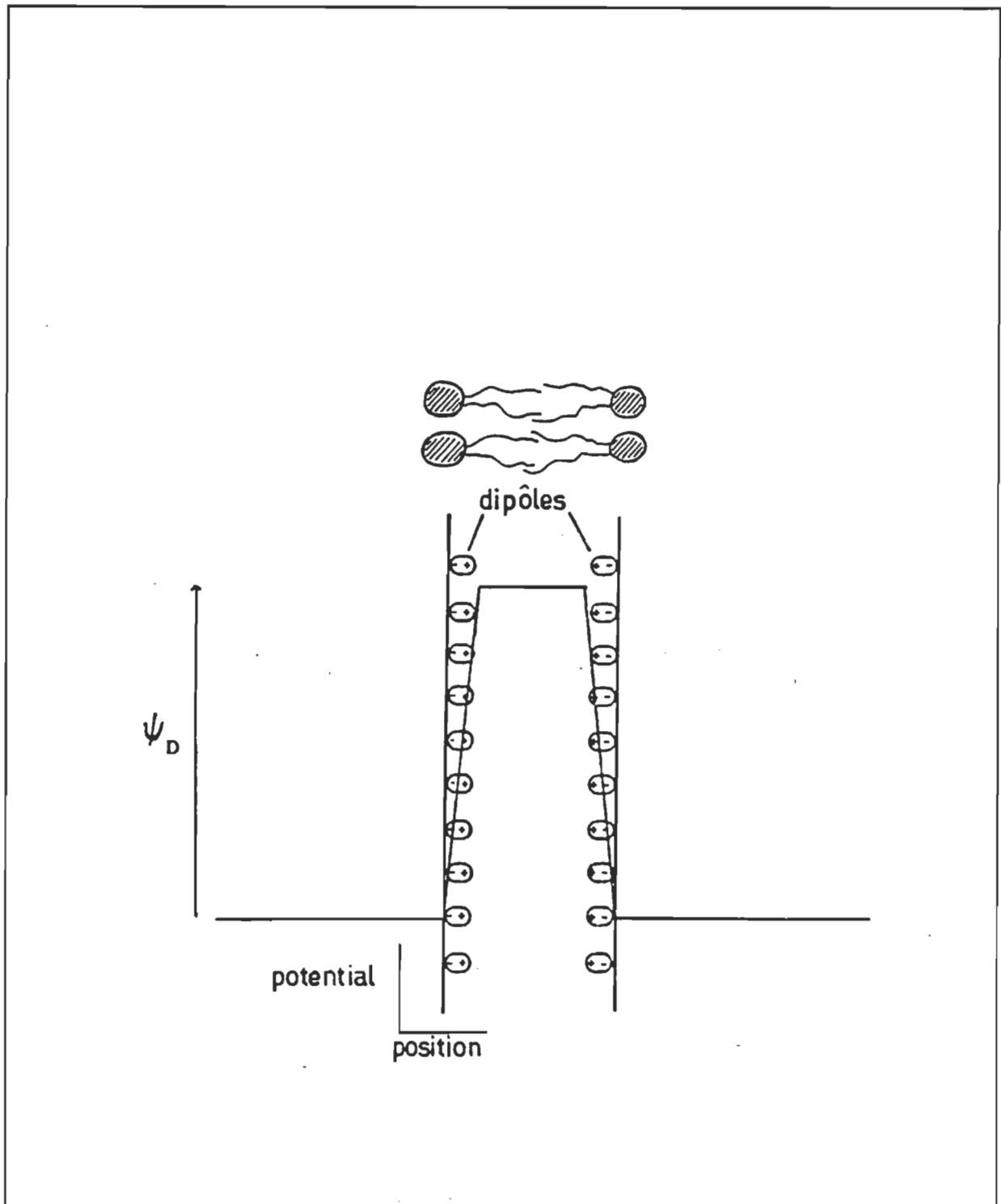


Figure 2.4. – Illustration du potentiel dipolaire d'une bicouche lipidique symétrique. La position relative des quatre plans de charges, par rapport aux phospholipides schématisés en haut de la figure, n'est que très approximative. (Tiré de Donovan, 1979).

Mathématiquement, le profil du potentiel dipolaire d'une bicouche asymétrique est donné par l'équation 2.17.

$$\psi_D(x) = \begin{cases} \psi_{D1} \cdot \frac{x}{d_1} & x \in [0, d_1] \\ \frac{\Delta\psi_D}{\Delta d} \cdot x + \psi_{D1} - d_1 \cdot \frac{\Delta\psi_D}{\Delta d} & x \in [d_1, d_2] \\ \frac{\psi_{D2}}{d_2 - 1} \cdot (x - 1) & x \in [d_2, 1] \\ \approx 0 & x \notin [0, 1] \end{cases} \quad [2.17]$$

- ψ_{D1} : potentiel dipolaire du côté 1 (mV)
- ψ_{D2} : potentiel dipolaire du côté 2 (mV)
- d_1 : longueur du dipôle effectif du côté 1 (-)
- d_2 : longueur du dipôle effectif du côté 2 (-)

Les longueurs sont ici exprimées en fraction de la distance entre les plans de charges 1 et 4, $\Delta\psi_D$ est égal à $\psi_{D2} - \psi_{D1}$, et ψ_{D2} et ψ_{D1} sont donnés par:

$$\psi_{D1,2} = \frac{n_{1,2} p_{1,2}}{\epsilon_0 \epsilon_{M1,2}}$$

où les indices 1 et 2 réfèrent ici aux feuillets 1 et 2 de la bicouche.

La simplicité de ce modèle lui vaut une grande popularité mais si froidement l'on songe à la complexité de la bicouche ou même de la monocouche phospholipidique, des frissons peuvent nous parcourir l'échine. Le modèle de Helmholtz présuppose des plaques planes, infiniment grandes, uniformément chargées, et entre lesquelles se trouve un diélectrique de composition homogène. Autre limitation dans le cas des bicouches: le modèle néglige les interactions entre les deux rangées de dipôles.

Quelques chercheurs tentèrent d'améliorer le modèle. Citons Pickard et ses collaborateurs (Pickard, Sehgal & Jackson, 1979) qui utilisèrent l'équation de Helmholtz pour chacune des contributions de dipôles. Les auteurs en reconnaissant trois, leur modèle inclut trois valeurs de moment dipolaire et trois valeurs de permittivité relative. Citons aussi Dorn (1985) qui dériva des expressions pour une rangée et un plan de dipôles discrets, et compara les

résultats avec ceux obtenus en considérant les charges positives et négatives individuellement. Malheureusement, ces expressions et ces calculs, comme ceux de Lundström (1977), ne sont pas toujours directement applicables à la structure bilipidique. De leur côté, Kleijn & Bruner (1983) examinèrent l'effet de l'adsorption de dipôles (considérés comme des charges discrètes) sur la perméabilité d'ions liposolubles. L'étude est intéressante à bien des égards, mais décevante à bien d'autres...

Le modèle me semblant le plus satisfaisant est celui de Flewelling & Hubbell (1986). Ces chercheurs calculèrent le potentiel d'une charge élémentaire partant de l'infini et passant au travers de deux réseaux carrés de dipôles ponctuels ²². Calculant cette différence de potentiel à différents endroits, ces auteurs obtinrent un profil du potentiel dipolaire. Afin de rendre le modèle un peu plus conforme à la réalité, les auteurs firent varier la valeur de la permittivité relative aux deux interfaces. Le profil de potentiel obtenu est réaliste mais demeure passablement spéculatif, compte tenu de notre relative ignorance de la valeur du moment dipolaire du dipôle effectif, de l'emplacement des plans de dipôles, et du profil de la permittivité relative.

2.1.2.6 Importance biologique du potentiel dipolaire

Vu la relative méconnaissance du potentiel dipolaire, peu d'études lui ont été consacrées sur la membrane *in vivo*. Il est toutefois reconnu qu'une diminution du potentiel dipolaire de la membrane serait vraisemblablement à l'origine du mécanisme d'action, entre autres: de la phlorétine en tant qu'inhibitrice du transport d'ions Cl⁻ au travers de la membrane de l'érythrocyte (Gunn & coll., 1975), d'élément perturbateur des courants potassique et sodique de la membrane neuronale (Stritchartz & coll, 1980); de l'acide salicylique et ses dérivés sur la conductance de la membrane neuronale (Levitan & Barker, 1972); d'agents découplants de la phosphorylation oxydative tels le FCCP, le CCCP (Reyes & Benos, 1984) et le gossypol (Reyes & coll., 1984); d'agents herbicides tel l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (Smejtek & Paulis-Illangasekare, 1979) et d'agents fongicides tel le 3-phénylindole (Sinha & Smejtek, 1983).

22 Pour être plus précis, les auteurs supposent que la charge passe en plein centre d'une maille du réseau.

En fait, l'on peut raisonnablement présumer que toute molécule fortement dipolaire possédant une affinité pour la membrane à l'étude risque de perturber le fonctionnement normal de celle-ci. Notons qu'aucune étude *in vivo* n'a jusqu'ici mis en évidence un potentiel transmembranaire d'origine dipolaire.

2.1.2.7 Potentiel de Gouy et potentiel dipolaire

Le potentiel de Gouy et le potentiel dipolaire ayant une origine différente et bien caractérisée, il semble naturel de les traiter indépendamment. En première approximation toutefois car on ne peut exclure a priori que les deux potentiels ne s'influencent réciproquement. La présence de dipôles interfaciaux peut modifier le champ électrique que ressentent les ions aux abords d'une membrane chargée et même donner naissance à une double couche électrique (Ohki, 1985). Inversement, les charges surfaciques et les contre-ions peuvent modifier l'orientation des dipôles phospholipidiques et des molécules d'eau affectant ainsi le potentiel dipolaire. Les théoriciens tels Lundström et Bruner prévoient de tels effets. Sans oublier Simon & McIntosh (1989) qui donnent au potentiel dipolaire la même portée que le potentiel d'hydratation, soit environ 0,8 nm.

Sur le plan expérimental, il semble bien que les deux contributions puissent être considérées dans de nombreuses situations comme étant indépendantes (Hladky & Haydon, 1973; Tosteson & Wieth, 1979; Goormaghtigh & coll., 1982), mais pas toujours (Haydon & Myers, 1973). Il est difficile de se montrer catégorique. D'autant plus que les modèles de Gouy-Chapman-Stern et de Helmholtz sont souvent modifiés ad hoc. L'avènement d'une théorie cohérente d'un potentiel membranaire englobant les deux contributions serait évidemment l'idéal. Zimanyi & Garab (1989) ont modélisé le champ électrique produit par une charge discrète et un dipôle discret dans la membrane. Des cartes isopotentiellles, couvrant autant la phase membranaire que la phase aqueuse, sont présentées mais nous sommes loin du compte...

En absence de données claires sur le sujet nous sommerons spatialement sans ménagement les deux contributions. Sous ces conditions, l'aspect du potentiel près et au travers d'une bicouche phospholipidique chargée serait celui représenté à la **figure 2.5**.

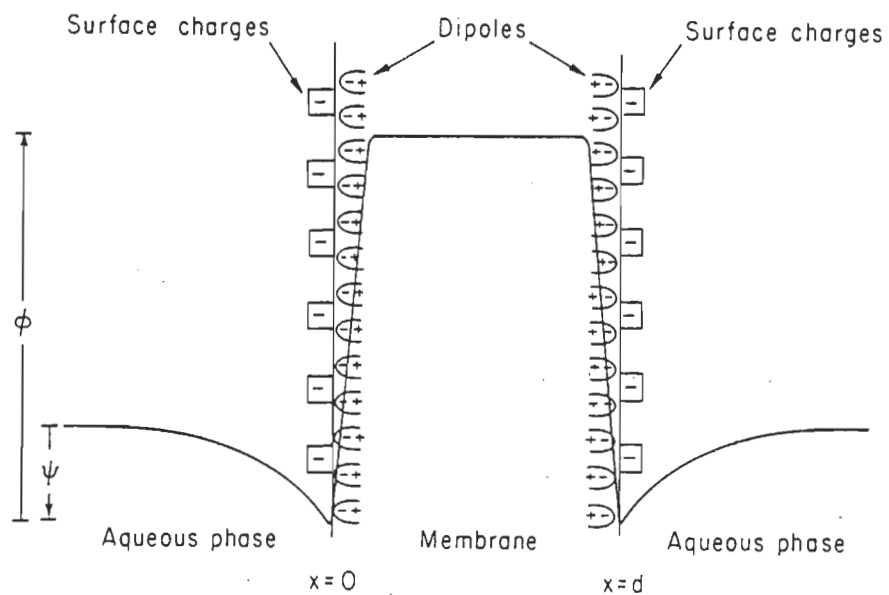


Fig. 4. Schematic representation of electrostatic profile across a lipid bilayer having fixed surface charges and interfacial dipoles. ψ is aqueous diffuse double-layer potential, generally negative due to the scarcity of positively charged lipids (WHITE, 1973). ϕ is dipole potential. It is assumed that no potential changes occur in the membrane interior

Figure 2.5. – Illustration du potentiel de Gouy et du potentiel dipolaire d'une bicouche lipidique symétrique. Les deux potentiels sont respectivement notés, ψ et ϕ . (Tiré d'Andersen, 1978, p.386).

Nous venons ici de déterminer quelle est la barrière de potentiel que doit franchir une charge ayant la curieuse idée de traverser la membrane mais serait-ce toujours cette même barrière que franchirait effectivement notre charge-test ? Non, il faudrait alors tenir compte de l'énergie de Born, de celle associée aux forces images et de celle associée au potentiel de distribution.

2.1.3 Énergie de Born et force image

L'énergie de Born («self-charging energy») est l'énergie résultant du transfert d'une charge d'un milieu de permittivité relative ϵ_1 , à un milieu de permittivité relative ϵ_2 . Un ion passant de la phase aqueuse ($\epsilon_W \approx 80$) à l'intérieur de la membrane ($\epsilon_M \approx 2$) acquiert une grande énergie potentielle. Cette différence d'énergie est donnée par:

$$U_B(x) = \begin{cases} \frac{Z^2 e^2}{8 \pi \epsilon_0 r_i} \left(\frac{1}{\epsilon_M} - \frac{1}{\epsilon_W} \right) & x \in [r_i, d-r_i] \\ \approx 0 & x \notin [r_i, d-r_i] \end{cases} \quad [2.18]$$

U_B : énergie de Born (J)
 e : charge élémentaire (= $1,602\,189 \cdot 10^{-19}$ C)
 r_i : rayon de l'ion (m)

Si nous regroupons les termes constants et transformons les unités SI en unités plus pratiques, nous obtenons dans le cas qui nous préoccupe, l'expression 2.18b :

$$U_B = 131 Z^2 / r_i \quad [2.18b]$$

où U_B est l'énergie de Born exprimée en unités kT (à 298 K), Z est la valence de l'ion et r_i son rayon en Å. Ainsi, le transport d'un ion K^+ ($r_i = 1,33$ Å) de la phase aqueuse à l'intérieur du milieu hydrocarboné nécessite une énergie voisine de 100 kT (l'énergie potentielle d'une charge élémentaire à 2,5 V !). Pour l'ion Ca^{++} un peu plus petit, nous atteignons le chiffre pharamineux de 520 kT. À la lumière de ces chiffres, nous apprécions mieux la barrière que représente la bicouche lipidique pour un petit ion. L'énergie de Born constitue la majeure partie de la barrière de potentiel que doit franchir l'ion lors de son passage au travers de la bicouche. Soulignons que cette énergie U_B affecte moins son

transfert qu'il ne le conditionne. En effet, le coefficient de partition, γ , de l'ion dans la membrane est donné (négligeant les autres contributions du potentiel) par:

$$\gamma = \exp (- U_B / kT)$$

Ainsi, pour une barrière de 100 kT, nous aurons une concentration d'ions dans la membrane 10^{44} fois moindre que dans la phase aqueuse. Soulignons que les ions de dimensions plus grandes ont une marche plus petite à franchir. Par exemple, un ion univalent de 6,3 Å de rayon (rayon moyen du complexe nonactine- K^+) n'a besoin "que" de 21 kT pour franchir la barrière hydrocarbonée. Mais attention, les valeurs calculées ici ne sont qu'approximatives. L'équation 2.18 n'est valide que pour des ions *impolarisables* situés à une distance *infinie* de l'interface diélectrique (Bockris & Reddy, 1970). Elle n'est évidemment pas valide pour un ion de forte taille se retrouvant à l'intérieur d'une membrane, laquelle ne peut être considérée comme un milieu semi-infini.

L'expression de l'énergie de Born peut être corrigée dans le cas d'un ion situé près de l'interface diélectrique en faisant appel à la force image. Voyons brièvement de quoi il en retourne. Un ion, comme toute charge, est à l'origine d'un champ électrique. Si cet ion est près de l'interface, le champ produit par l'ion sera suffisamment fort pour la polariser. Ces charges induites à l'interface créent un champ électrique qui s'ajoute à celui agissant sur l'ion. La méthode des images bien connue en électrostatique permet de calculer les forces qu'exercent les charges de polarisation sur l'ion à l'étude. Elle consiste à remplacer ces charges de polarisation par une charge fictive (la charge-image) située à une distance x égale à celle séparant l'ion de l'interface. La force s'exerçant entre l'ion et la charge-image s'appelle la force image.

Dans le cas qui nous occupe, il faut tenir compte du fait que l'ion polarise les deux interfaces de la membrane et que ces deux interfaces se polarisent mutuellement; et pour simuler adéquatement le nouvel environnement électrique - causé, rappelons-le, par la présence de l'ion - nous devons aligner une infinité de charges images de part et d'autre de la membrane. L'expression résultant de la force image (et le détail du procédé) apparaît dans l'article de Neumcke et Läuger (1969). On y retrouve quatre sommes infinies que l'on doit évaluer. Flewelling & Hubbell (1986b) proposèrent une formulation tronquée de l'énergie potentielle due à la force image (équation 2.19):

$$U_I(x) = \begin{cases} -\frac{Z^2 e^2}{8 \pi \epsilon_0 \epsilon_M} \cdot \left(\frac{1}{2x} + \zeta(3) \frac{x^2}{d^3} \right) & x \in \left[r_i, \frac{d}{2} \right] \\ \approx 0 & x \notin \left[r_i, \frac{d}{2} \right] \end{cases} \quad [2.19]$$

- U_I : énergie potentielle "image" (J)
 x : distance entre l'ion et l'interface diélectrique la plus proche (m)
 d : épaisseur de la région de permittivité ϵ_M (m)
 ζ : fonction zêta de Riemann

Utilisant cette relation pour un ion univalent situé à 5 Å et 20 Å à l'intérieur d'une membrane d'épaisseur égale à 40 Å, nous obtenons des valeurs d'énergie-image de -13 et -4 kT respectivement. Deux points à retenir: d'abord le signe négatif indiquant une énergie favorable au passage de l'ion, quel que soit le signe de sa charge; puis le fait - attendu - que l'énergie de Born se trouve diminuée d'autant plus fortement que l'ion se trouve près de l'interface. Nous retrouvons à la **figure 2.6** le profil de l'énergie de Born corrigée pour les forces images dans le cas d'un ion de 2 Å de rayon traversant une membrane de 50 Å d'épaisseur.

Notons que l'équation (2.19) n'est valide que pour des distances comprises entre r_i et $d/2$. Très près de l'interface, la fonction $U_I(x)$ peut être lissée par une fonction-queue (Flewellling & Hubbell, 1986b). Notons aussi que cette même équation 2.19 n'est applicable que pour un ion sphérique impolarisable situé entre deux interfaces diélectriques discontinues et non déformables. Bradshaw et Robertson (1975) discutèrent de l'effet de la polarisabilité de l'ion sur l'énergie due à la force image et des répercussions possibles sur le transport ionique. La polarisabilité affectant à la fois le coefficient de partage de l'ion et la hauteur (mais pas la forme) de la barrière de potentiel à franchir, il devient difficile de s'y retrouver. Parsegian (1969, 1975) s'est quant à lui penché sur le problème de déformation de l'interface. Il démontra que le champ électrique produit par l'ion est suffisamment fort pour déformer la membrane... à un point tel que les deux interfaces pourraient se toucher. Andersen (1978) fait remarquer, toutefois, que le temps requis pour créer de telles distorsions excéderait probablement celui du passage de l'ion.

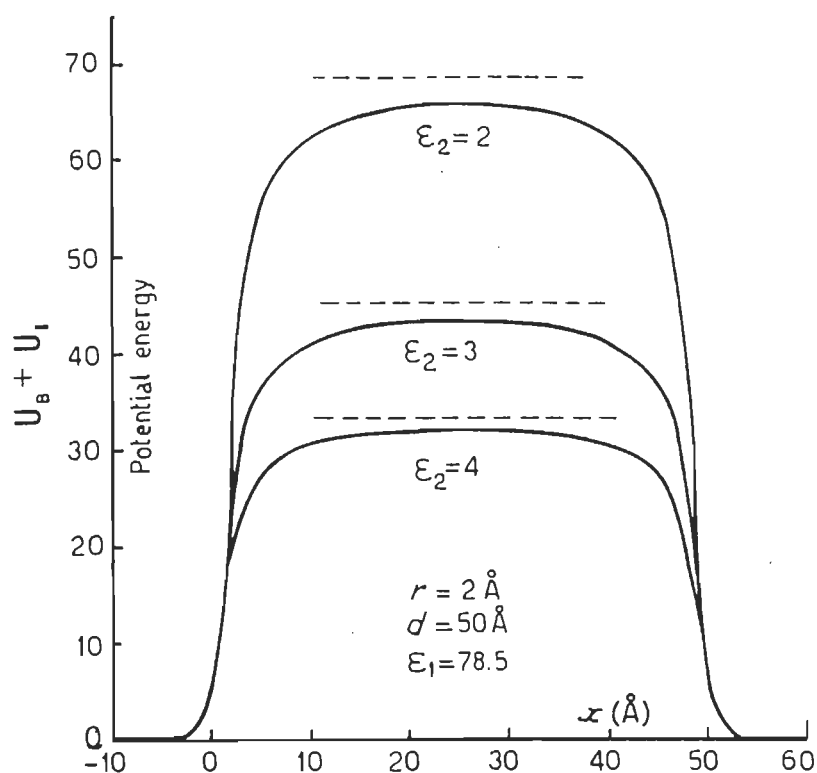


Fig. 1. — Potential energy $U_B + U_I$ in units of kT of a univalent ion of radius $r = 2$ Å = 0.2 nm in a membrane of thickness $d = 50$ Å and dielectric constant ϵ_m [2]. The dashed lines indicate the Born energy of the ion in the limit $d \rightarrow \infty$

Figure 2.6. — Illustration de l'énergie de Born et de l'énergie associée à la force-image. Les traits en pointillé représentent l'énergie de Born (milieu d'épaisseur infinie) alors que les courbes en traits pleins sont déterminées en sommant l'énergie de Born, U_B , et l'énergie reliée à la force image, U_I (milieu d'épaisseur finie). (Tiré de Laüger, 1987).

2.1.4 Potentiel de distribution

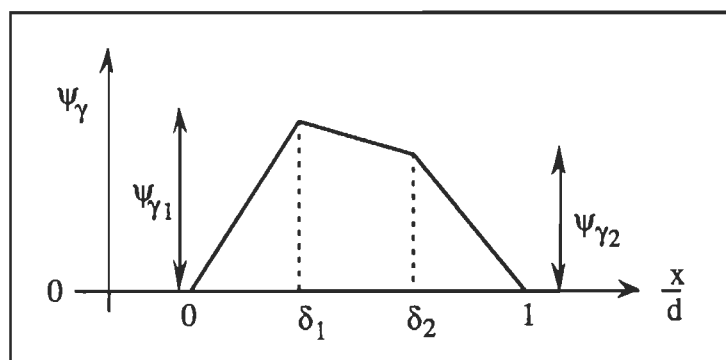
Il y a naissance d'un potentiel de distribution («adsorption, distribution, boundary potential») lorsque le coefficient de partition des espèces négatives diffère de celui des espèces positives. C'est ce qui se produit pour un sel du type du tétraphénylborate de sodium (NaTPB). L'anion TPB⁻ liposoluble se partitionne favorablement dans la membrane (à un endroit spécifique comme nous le verrons tantôt) alors que le cation Na⁺ demeure dans la phase aqueuse, *près* de l'interface. Rapidement, nous assistons à une distribution inégale des espèces chargées entre la phase aqueuse et l'intérieur de la membrane. Une différence de potentiel électrique apparaît: le potentiel de distribution, ψ_γ .

Le modèle du condensateur plan est ici encore utilisé et la valeur de ψ_γ est donnée par l'équation 2.20 (McLaughlin, 1977);

$$\psi_\gamma = \frac{Z}{RT} \frac{\delta}{\epsilon_0 \epsilon_m} \exp\left(-\frac{Z}{RT} \psi_\gamma\right) \quad [2.20]$$

- ψ_γ : potentiel de distribution (V)
- K : constante d'approximation (m)
- C : concentration de l'ion liposoluble dans la phase aqueuse (mol·m⁻³)
- δ : distance entre l'ion liposoluble et son contre-ion (m)
- ϵ_M : permittivité diélectrique du milieu où s'adsorbe l'ion (-)

Pour une bicouche lipidique, nous avons de nouveau quatre plans de charges et le profil de potentiel prend la même forme trapézoïdale que tantôt:



et l'équation du profil du potentiel de distribution est identique à l'expression 2.17, à ceci près qu'il faut substituer aux positions "d" les positions "δ" et que les potentiels aux coins du trapèze sont donnés par 2.21:

$$\psi_{\gamma 1} = \frac{\mathfrak{I} K_1 C_1 \delta_1 d}{\epsilon_0 \epsilon_{M 1}} \cdot \exp\left(-\frac{Z \mathfrak{I} \psi_{\gamma 1}}{RT}\right) \quad [2.21]$$

$$\psi_{\gamma 2} = \frac{\mathfrak{I} K_2 C_2 (1 - \delta_2 d)}{\epsilon_0 \epsilon_{M 2}} \cdot \exp\left(-\frac{Z \mathfrak{I} \psi_{\gamma 2}}{RT}\right) \quad [2.21]$$

où les indices 1,2 réfèrent aux côtés 1 et 2 de la membrane.

Andersen & coll. mesurèrent en 1978 le potentiel de distribution produit par l'ion TPB⁻ au sein de bicouches de PE à différentes concentrations de TPB⁻. À 1 μM, le potentiel mesuré, selon le modèle du condensateur, est de -20 mV alors qu'il atteint -110 mV à 100 μM. Ce potentiel de distribution, important à grande concentration, peut affecter la conductance ionique de deux façons: i) en modifiant la barrière de potentiel (phénomène mis en évidence par des expériences du type «charge-pulse») et ii) en modifiant l'adsorption des espèces ioniques à l'interface. La présence d'un potentiel de distribution permet d'expliquer la saturation de la conductance à grande concentration de TPB⁻ (le potentiel de distribution négatif limitant l'adsorption subséquente de TBP⁻) (Andersen & coll., 1978). Il permet aussi d'expliquer l'action catalysante de l'ion TPB⁻ sur le transport de cations à l'intérieur de la mitochondrie (Bakeeva & coll., 1970).

Signalons que les potentiels de distribution ne sont pas l'apanage des ions liposolubles; les transporteurs, une fois complexés, y sont sujets également. Hansen (1978) les met d'ailleurs en cause pour expliquer la forte asymétrie des courbes I-V de bicouches PE/PC dopées à la valinomycine.

2.1.5 Énergie potentielle dite neutre

Nous avons étudié jusqu'ici les contributions électrostatiques majeures à la barrière de potentiel. Cette courte section sera consacrée aux autres contributions de la barrière de potentiel. Elles sont habituellement regroupées sous le terme commun d'énergie neutre

(«neutral energy»). Cette énergie, symbolisée par U_N , est égale à la variation d'énergie libre de l'ion lors de son transfert de la phase aqueuse à la phase lipidique en ne prenant pas en considération le fait qu'il soit chargé. Selon différents auteurs (Flewelling & Hubbell, 1986b; Israëlachvili, 1985), l'énergie neutre comprend l'énergie associée à l'effet hydrophobe, aux interactions de type Van der Waals entre l'ion et la membrane, aux interactions entre moments quadrupolaires et moments électriques supérieurs, à certaines interactions "chimiques" spécifiques et à des effets de répulsion stérique. Pour des ions liposolubles (le cas qui nous intéresse ici), la principale contribution provenant de "l'énergie hydrophobe" (Flewelling & Hubbell, 1986b) et de la variation d'énergie libre hydrophobe, le terme entropique serait prédominant (Israëlachvili, 1985). Différentes relations semi-empiriques de la forme:

$$U_N = - b S \quad [2.22]$$

U_N : énergie potentielle neutre (J)
 b : constante de proportionnalité ($J \cdot m^{-2}$)
 S : surface de l'ion en contact avec l'environnement hydrophobe (m^2).

sont utilisées pour estimer U_N (Hermann, 1972; Reynolds & coll, 1974; MacDonald, 1976). La constante b peut prendre des valeurs variant entre 10 et 40 $mJ \cdot m^{-2}$ et comme le note Andersen (1978), elle peut être approchée par la tension interfaciale milieu hydrocarboné-eau. Elle correspondrait donc dans ce contexte à l'énergie requise pour amener une poche d'eau de surface S à l'intérieur de la membrane (MacDonald, 1976). Actuellement, les différents chercheurs dans ce domaine tentent de calculer la constante b en fonction de différents paramètres reliés à la molécule. Différentes échelles d'énergie libre de transfert sont proposées dépendamment de la nature de certains groupements fonctionnels, des différents acides aminés, et même du degré d'"exposition" de ces acides aminés (Guy, 1985). Ces échelles d'énergie de transfert faisant encore l'objet de débats, nous nous contenterons d'évaluer grossièrement l'énergie neutre. Utilisant l'équation 2.22, nous obtenons pour l'ion TPB^- de 4,2 Å de rayon une valeur de U_N comprise entre -6 et -22 kT²³. Pour un ion de la taille du complexe nonactine- K^+ , U_N peut varier entre -14 et -50 kT. Comme nous pouvons le constater, les énergies neutres abaissent sensiblement la barrière

²³ Une détermination expérimentale récente donnerait une valeur de -13 kT (Flewelling & Hubbell, 1986a).

d'énergie potentielle totale que doit franchir un ion liposoluble de grand taille. Concernant le profil de U_N en fonction de la distance, il peut être donné par l'équation 2.23:

$$U_N(x) = \begin{cases} U_N & x \in [r_i, d-r_i] \\ \approx 0 & x \notin [r_i, d-r_i] \end{cases} \quad [2.23]$$

où r_i est le rayon de l'ion liposoluble. Flewelling et Hubbell (1986b) utilisent près des interfaces membranaires une fonction sigmoïdale d'épaisseur $2 r_i$ centrée dans une région de permittivité égale à 10. Le profil résultant de l'énergie "neutre" apparaît à la **figure 2.7**.

2.1.6 Barrière d'énergie potentielle totale

L'étude de chacune des contributions susceptibles d'affecter notre sonde de potentiel étant complétée, nous passerons enfin à la barrière d'énergie potentielle que rencontre notre sonde. Pour y arriver, nous devons sommer, en tous points, chacune des contributions:

$$U(x) = Ze \left[\psi_{DC}(x) + \psi_D(x) + \psi_Y(x) \right] + U_B(x) + U_I(x) + U_N(x) \quad [2.24a]$$

où U est l'énergie potentielle totale (J). Pour passer de l'énergie potentielle au potentiel total il suffit de diviser U par la charge de notre sonde soit Ze . Nous obtenons alors l'équation 2.24b.

$$\psi(x) = \psi_{DC}(x) + \psi_D(x) + \psi_Y(x) + \left(\frac{U_B(x) + U_I(x) + U_N(x)}{Ze} \right) \quad [2.24b]$$

Cette démarche se révèle toutefois extrêmement difficile, certaines expressions de ces potentiels étant pour le moins imprécises... Que deviennent $U_B(x)$ et $U_I(x)$ si nous tenons compte de la variation de la permittivité relative à l'interface ? Quel est le profil de $\epsilon_M(x)$? Quel est le moment dipolaire moyen d'un phospholipide ? Où se situe ce dipôle moyen par rapport à l'interface ? Où les ions liposolubles et les transporteurs s'adsorbent-ils ? À quelle distance se situent-ils de leur contre-ions ? Quelle est la valeur de $U_N(x)$?

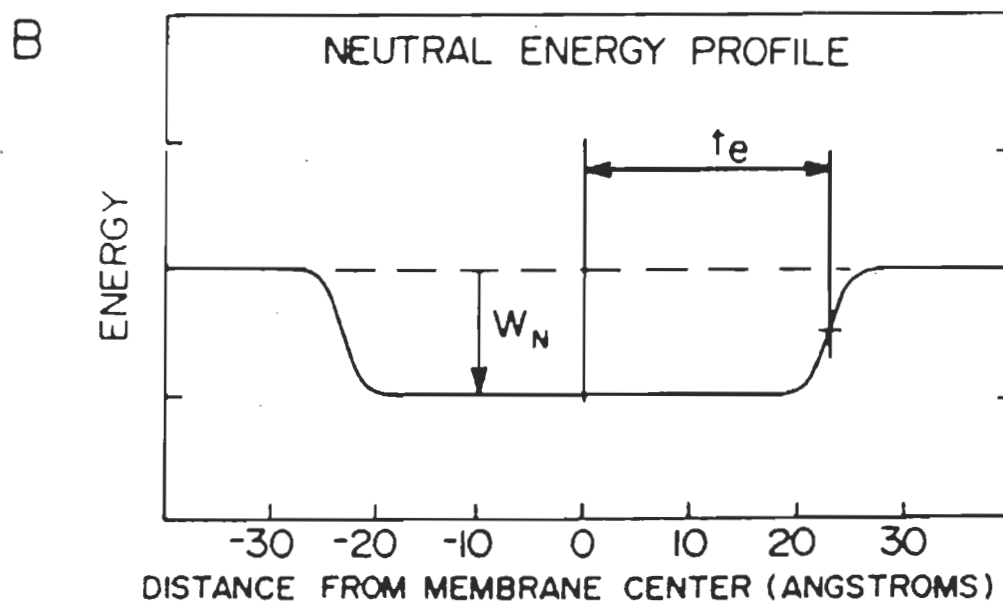


Figure 2.7. – Profil de l'énergie potentielle "neutre". La largeur de la transition est égale au diamètre de l'ion (ici 8 \AA). (Tiré de Flewelling & Hubbell, 1986b).

Le profil convoité apparaît pour l'instant brumeux mais il est important de regarder dans sa direction, de tenter d'en percevoir les lignes. La première tentative sérieuse visant à dessiner la barrière de potentiel revient à Flewelling & Hubbell (1986b). En donnant aux différents paramètres de leur modèle du "potentiel total" ²⁴ des valeurs raisonnables, ils purent établir semi-quantitativement le profil de la barrière d'énergie rencontrée par des petits ions de 2 et 3 Å de rayon (et pour des ions liposolubles tels le TPB⁻ et le TPAs⁺) lors de leur passage au travers d'une bicouche phospholipidique. Des traits se dégagent (voir la barrière d'énergie totale reproduite à la **figure 2.8**). Parmi ceux-ci, notons l'existence i) de puits de potentiel (sauf pour de petits cations) près des interfaces où les ions seraient susceptibles de s'accumuler ii) de puits plus profonds pour les anions que pour les cations (influence de ψ_D), iii) d'une barrière centrale ayant grossièrement la forme d'une cycloïde (causée par les forces images) et dont la hauteur iv) serait nettement plus élevée pour les cations que pour les anions (influence de ψ_D). Les auteurs mentionnent aussi le fait que le profil de potentiel est très sensible à la densité de dipôles à l'interface et que la plus grande part de l'imprécision provient de la contribution de l'énergie neutre. Notons en terminant que la barrière modélisée par Flewelling & Hubbell est symétrique. Cela revient à dire que les côtés 1 et 2 de la bicouche sont considérés identiques ainsi que les milieux la bordant (pas de "déformation" de la barrière par une différence de potentiel transmembranaire d'origine nernstienne ou due aux doubles couches électriques).

2.1.7 Superposition d'un potentiel extérieur à la barrière d'énergie totale

La barrière totale peut être "déformée" également suite à l'imposition d'un potentiel extérieur. Or ne disions-nous pas, à la section 1.4 que l'on pouvait déterminer les potentiels membranaires par des mesures de conductance à faible tension ou en faisant varier la tension appliquée. Dans les deux cas nous mesurons le nombre de charges par unité de temps qui franchissent la barrière lorsque nous appliquons extérieurement un potentiel à l'aide d'une source de tension. Dans le premier cas, nous déformons la barrière d'une manière donnée. De la mesure à faible tension, nous n'avons qu'un seul couple courant-tension. En faisant varier continûment la tension appliquée nous obtenons un plus grand nombre de couples. La mesure de conductance à tension fixe nous donne une image de la

²⁴ Leur potentiel total n'inclut toutefois pas le potentiel de distribution...

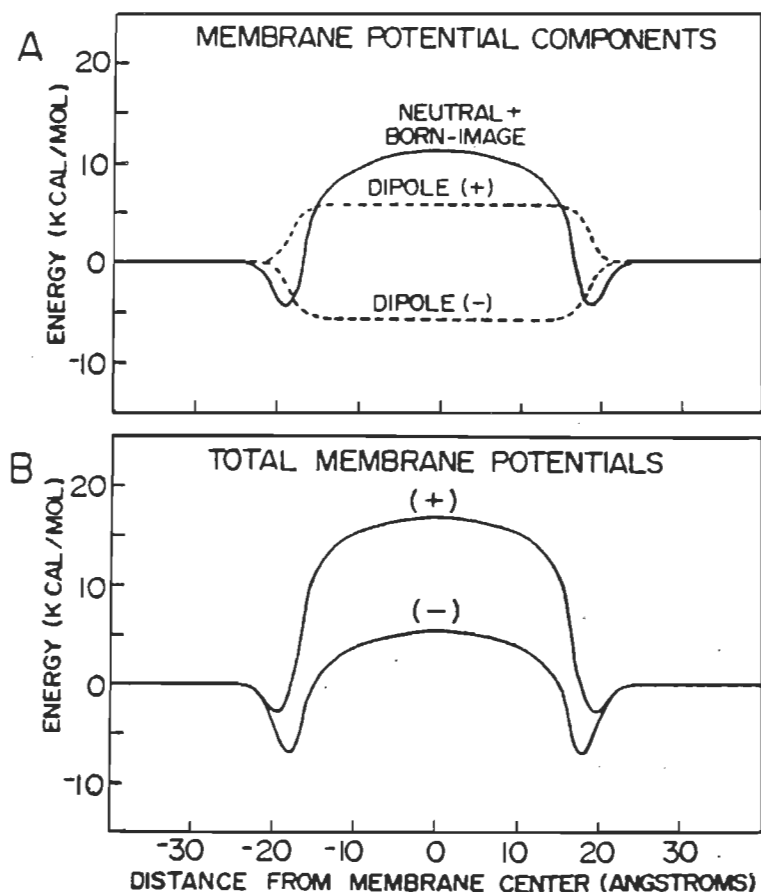


FIGURE 4 Membrane potential components and total potential profiles based on Eqs. 1, 4, and 6–10 of the text, characteristic of hydrophobic anions (–) and cations (+). (A) Combined neutral plus Born-image energy profile (—) together with dipole potential profiles (---). (B) Resulting total potential energy profiles giving a good fit to the experimental data for TPP^+ and TPB^- (Table II) with the following parameter values: $t = 18 \text{ \AA}$, $h = 8 \text{ \AA}$, $p = 24 \text{ \AA}$, $a = 8.13 \text{ \AA}$, $u = 0.85 \text{ D}$, $r = 4.2 \text{ \AA}$, $q = e$, $\epsilon_1 = 2$, $\epsilon_2 = 78$, and $W_N = -7.5 \text{ kcal/mol}$.

Figure 2.8. – Barrière d'énergie potentielle totale calculée pour un ion liposoluble de 0,42 nm de rayon. Les unités d'énergie peuvent être transformées en unités kT (à 25°C) en multipliant l'échelle par un facteur de 1,69. (Tiré de Flewelling & Hubbell, 1986b).

barrière alors que les courbes I-V ont l'avantage de "tester" la barrière de potentiel en la déformant selon différents "angles" fournissant ainsi une image mieux "résolue" de la barrière. D'un point de vue strictement informationnel, mille points sur une courbe I-V correspondent à mille mesures à tension fixe et à beaucoup plus si l'on déforme mille fois la barrière sous une même tension. Les courbes courant-tension permettent de mieux caractériser la barrière de potentiel. Cela se conçoit aisément.

Revenons à la superposition du potentiel intrinsèque (équation 2.24b) et du potentiel extérieur. Nous ferons d'abord l'hypothèse fondamentale que le potentiel appliqué, V , n'affecte pas la structure de la membrane. Le potentiel appliqué déforme la barrière mais d'une manière "élastique" pourrait-on dire. Ainsi si nous soustrayons du potentiel ressenti par l'ion lors de la mesure I-V la composante du potentiel appliqué, nous devrions retrouver le même potentiel de barrière (le potentiel intrinsèque). Symboliquement, nous avons:

$$\psi'(x) = \psi(x) + V(x) \quad [2.25a]$$

- ψ' : potentiel total que ressent l'ion (V)
- ψ : potentiel intrinsèque de la barrière (V)
- V : potentiel appliqué de part et d'autre de la membrane (V)

Il est coutume afin d'alléger les expressions de rendre les différents potentiels sans dimensions en les multipliant par un facteur dépendant exclusivement de la température:

$$\phi'(x) = \frac{z}{RT} \psi'(x)$$

- ϕ' : potentiel normalisé agissant sur l'ion (-)

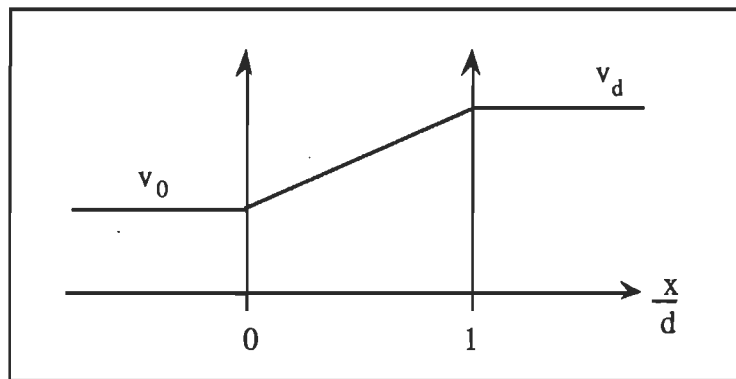
Ce qui donne:

$$\varphi'(x) = \frac{\mathfrak{S}}{RT} [\psi(x) + V(x)] = \varphi(x) + v(x) \quad [2.25b]$$

φ : potentiel intrinsèque normalisé (-)

v : potentiel appliqué normalisé (-)

Il nous reste maintenant à définir $v(x)$. Nous présumerons encore ici que le champ extérieur n'est pas perturbé par la présence de charges à l'intérieur du milieu hydrocarboné. Le potentiel appliqué varie donc linéairement d'un côté à l'autre de la membrane tel que présenté sur le schéma qui suit:



et nous pouvons donc écrire:

$$v(x) = \begin{cases} v_0 & x < 0 \\ (v_d - v_0) \cdot \frac{x}{d} + v_0 & 0 < x < d \\ v_d & x > d \end{cases} \quad [2.26]$$

v_0 : potentiel appliqué du côté gauche ou cis (-)

v_d : potentiel appliqué du côté droit ou trans (-)

x : distance à partir de l'interface de gauche (m)

d : distance sur laquelle le potentiel appliqué varie (m).

2.2 Problématique de l'utilisation d'un transporteur comme sonde de potentiel

Nous venons de voir le profil de la barrière de potentiel que rencontre notre sonde chargée au cours de son périple au travers de la membrane. Il nous faut maintenant relier ce profil de potentiel à ce que nous mesurons, c'est-à-dire au couple courant-tension. N'oublions pas non plus que nous désirons éventuellement effectuer le chemin inverse: établir le profil de la barrière de potentiel à partir des données I-V.

Nous avons occulté jusqu'ici les aspects cinétiques du transport ionique médié par un transporteur. La conductance de bicouches dopées avec un transporteur dépend de bien d'autres facteurs que ceux reliés à la barrière de potentiel. Elle dépend aussi de la concentration de transporteur, de sa sélectivité envers les différentes espèces ioniques, de la concentration de ces espèces ioniques dans les phases aqueuses adjacentes à la membrane, aussi de la mobilité du transporteur dans la membrane. La conductance d'une bicouche dopée à la valinomycine ne sera pas la même qu'une autre dopée à la nonactine, toutes les conditions fussent-elles, par ailleurs, les mêmes.

Afin d'unir les données provenant d'études concernant des transporteurs différents (ou d'un même transporteur sous des conditions différentes), il nous faut relier, dans une même expression, les différents paramètres ci-haut mentionnés et ceux caractérisant la barrière de potentiel. Pour ce, nous avons besoin, et d'un mécanisme général d'action du transporteur, et d'une théorie où tous les paramètres reliés à la mesure de conductance se retrouvent.

2.2.1 Mécanisme d'action d'un transporteur

Les transporteurs dont il est question ici sont des substances généralement classées parmi les antibiotiques à large spectre antibactérien. Ce sont des oligopeptides, généralement neutres et d'une masse moléculaire voisine de 1 kDa. Leur structure peut être de forme cyclique (valinomycine, macrotétralides, enniatines, beauvéricine, antamanide) ou non (monensine, nigéricine, dianémycine, grisorixine). Les premiers, neutres, forment un complexe chargé positivement en se liant à des cations monovalents alors que les seconds sont des acides carboxyliques qui lient les cations sous leur forme anionique. Tous adoptent cependant une conformation particulière où nous retrouvons une cavité intérieure bordée

d'atomes d'oxygène, permettant la fixation du cation monovalent, et un extérieur bordé de groupements hydrophobes, favorisant l'entrée de la molécule dans le milieu hydrocarboné (Gale & coll., 1983, Grell & coll., 1975). La cavité intérieure, d'une "capacité" définie, confère aux transporteurs une grande sélectivité (plus grande encore que celle des canaux dits sélectifs). Cette sélectivité est directement liée aux constantes de complexation et ces dernières peuvent être estimées en calculant les interactions ion-dipôles entre l'ion et les groupements dipolaires tapissant l'intérieur du transporteur et en comparant les énergies d'interaction avec les calculs (ou mesures) des énergies d'hydratation (Eisenman & Horn, 1983).

Le transport ionique par l'entremise d'un transporteur s'effectue en quatre étapes: i) complexation du transporteur (neutre) avec l'ion, ii) translocation du complexe (chargé) au travers de la membrane, iii) dissociation du complexe, iv) retour du transporteur (neutre) à l'interface d'origine. Deux scénarios peuvent être envisagés concernant l'étape de complexation: dans le premier, la complexation entre le transporteur I et l'ion S a lieu dans la phase aqueuse (mécanisme P_{IS}) alors que dans le second, la complexation a lieu à l'interface (mécanisme R_{IS}). Évidemment, ces deux mécanismes peuvent se produire concurremment. De plus, chacune des réactions de ces mécanismes possède des constantes de vitesse qui lui sont propres. Est-ce l'étape de complexation qui limite le transport d'ions ? Est-ce l'étape de translocation ? Est-ce l'étape iii) ou l'étape iv) ? Sans oublier le fait que ces mécanismes P_{IS} et R_{IS} présupposent la diffusion de l'ion et du transporteur (si l'ajout s'effectue via la phase aqueuse) du coeur de phase aqueux à la phase membranaire; diffusion donc au travers de la couche immobile ²⁵ (« *unstirred layers* »). Cette diffusion peut être limitante et dans le cas d'un mécanisme P_{IS} mener à des potentiels de diffusion (« *aqueous diffusion polarization* ») si la conductance devient élevée (Stark, 1978). Diffusion aussi au travers de la double couche électrique. Une étude de Ranjagaran (1963) montre que le flux de particules peut être accéléré ou décéléré par le champ électrique de la double couche. Nous voici déjà - dans le cas d'une bicouche symétrique - avec un modèle incluant 14 constantes de vitesse ! Le modèle peut se complexifier davantage si l'on prend en ligne de compte la zone périphérique ceinturant la bicouche plane (Hladky, 1973). Dans le cas le plus simple (le seul phénomène considéré est la migration du transporteur libre de

²⁵ La couche immobile est une région du fluide adjacente à la membrane exempte de mouvement. Son épaisseur, de l'ordre de 100 μm , dépend de la géométrie, des dimensions de la membrane et de la qualité de l'agitation du compartiment aqueux (Haydon & Hladky, 1972).

l'intérieur de la membrane vers le coeur de la zone de transition), nous nous retrouvons avec 16 constantes de vitesses ²⁶. Cela est évidemment beaucoup trop. En général, les chercheurs utilisent le modèle de Ciani & coll. (1973) où les effets reliés à la zone de transition, à la couche immobile et à la double couche, ne sont pas considérés ²⁷. Ce modèle apparaît à la **figure 2.9**. Certains chercheurs (Stark, 1978; Andersen, 1978) jugent le modèle déjà trop complexe. Quelles sont les constantes de vitesse qui dépendent de la tension ? Quelles sont les réactions se déroulant à l'équilibre ?

Différentes méthodologies ont été développées afin de déterminer les différentes constantes de vitesse. Mentionnons les mesures de relaxation du courant suite à l'imposition d'un saut de voltage (Benz & Stark, 1975), ou d'un saut de température (Knoll & Stark, 1977), les mesures de relaxation de la tension suite à l'imposition d'un saut de courant (« *charge-pulse methods* ») (Feldberg & Kissel, 1975), les mesures de la conductance en fonction de la tension (Stark & Benz, 1971) et celles, enfin, dites d'analyse du bruit (Kolb & Laüger, 1978). De nombreux chercheurs ont contribué à élargir notre compréhension de ces mécanismes de conductance médiée, tant sur le plan théorique qu'expérimental. Parmi les équipes de recherche les plus importantes, citons une équipe anglaise (Haydon, Hladky & coll.), une allemande (Benz, Laüger, Stark & coll.) et une américaine (Eisenman, Ciani, Szabo, Mc Laughlin & coll.). Malheureusement chacune de ces équipes ayant développé un formalisme et une approche propre du problème, celui-ci peut vite devenir embrouillé pour le lecteur néophyte. Nous lui suggérons les revues suivantes: Haydon & Hladky (1972), Hladky, (1979), Laüger & coll. (1981) et Morf (1981) de même que les "articles-squelettes" suivants: Ciani & coll. (1969), Laüger & Stark (1970), Hladky (1972), Ciani & coll. (1973) et Ciani (1976).

²⁶ Au mieux nous nous retrouvons avec 10 variables à déterminer: 4 constantes de vitesse et 6 constantes d'équilibre.

²⁷ La correction pour la double couche n'est vraiment nécessaire que pour des mesures électriques faites à des fréquences supérieures à 1 kHz (De Levie & Seidah, 1974).

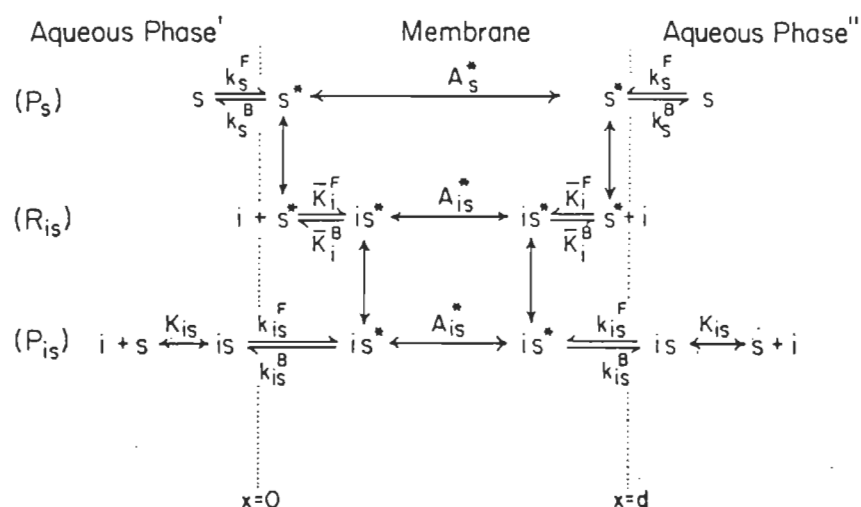


Fig. 1. Schematic diagram of the processes by which neutral carriers mediate permeation of ions through the membrane. The membrane is indicated to be interposed between two aqueous phases (') and (") and extends from $x=0$ to $x=d$. (P_s) refers to the partition process of the neutral carrier [Eq. (16)]. (R_{is}) refers to the interfacial reaction process [Eq. (17)], which involves the reaction at the interface between an ion in the aqueous phase and a carrier molecule already present in the membrane. (P_{is}) refers to the partition process of the complex [Eq. (18)], which involves the transfer of an already formed complex from the aqueous phase into the membrane

Figure 2.9. – Schéma général du mécanisme d'action d'un transporteur neutre. Le transporteur et l'ion sont ici symbolisés par les lettres S et I. L'astérisque indique que l'on se trouve à l'intérieur de la membrane. (Tiré de Ciani & coll., 1973),

Les multiples données obtenues montrent une influence de la concentration de transporteur utilisé, de la concentration de l'ion perméant, du type de lipide utilisé, de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées de ce lipide, du solvant utilisé (film noir) et de la température sur les différentes constantes de vitesse. L'élucidation de ces effets au niveau moléculaire reste très partielle cependant.

2.2.2 Choix de la nonactine

Pour y parvenir, nous devons expérimenter dans des conditions précises. Ainsi, si nous désirons étudier l'effet de la hauteur de la barrière de potentiel sur l'étape de translocation du complexe chargé, nous devons privilégier les situations où: i) le mécanisme dominant est du type R_{is} (transporteur confiné dans la phase lipidique), ii) l'étape de translocation est l'étape limitante (réactions interfaciales rapides) et iii) les réactions interfaciales sont à l'équilibre ²⁸. En ce qui nous concerne, ce sont justement les situations pour lesquelles il sera plus "facile" de déterminer le profil de la barrière à partir de la courbe I-V.

Sous ces mêmes conditions, i), ii) et iii), nous pourrions exprimer les concentrations interfaciales de nos sondes de potentiel en fonction de données expérimentales plus "immédiates" (Hall & coll., 1973; van Dijk & de Levie, 1985) :

$$C_{is}^M = C_i^W C_s^W K_A^W \gamma_{is} \quad [2.27]$$

où :

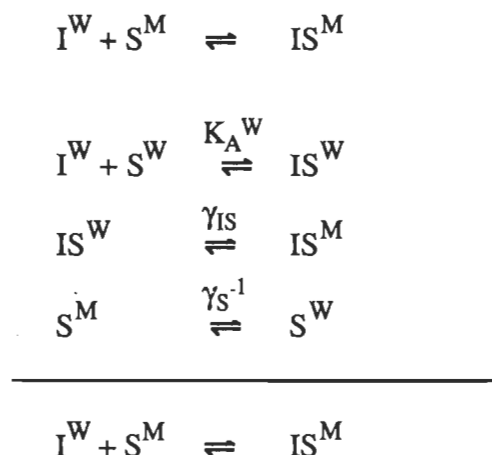
$$K_A^W = \frac{C_{is}^W}{C_i^W \cdot C_s^W} \quad \text{et} \quad \gamma_{is} \equiv \frac{C_{is}^M}{C_{is}^W}$$

- C_{is}^M : concentration interfaciale de complexes (mol • m⁻³)
 C_{is}^W : concentration de complexes dans la phase aqueuse (mol • m⁻³)
 C_i^W : concentration ionique dans la phase aqueuse (mol • m⁻³)

²⁸ Le système est alors dit en régime d'équilibre (« equilibrium domain »), par opposition au régime cinétique (« kinetic domain ») où la concentration de complexes varie en fonction du temps.

- C_s^W : concentration de transporteur dans la phase aqueuse ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$)
 γ_{is} : coefficient de partage du complexe (–)
 K_A^W : constante de complexation ion-transporteur dans la phase aqueuse ($\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)

On peut se surprendre de voir apparaître K_A^W et γ_{is} pour un mécanisme R_{is} , mais la concentration de transporteur dans la phase membranaire et la constante d'équilibre de la réaction de complexation ion-transporteur à l'interface n'étant point connues, il est nécessaire de scinder en trois la réaction hétérogène à l'interface:



- γ_s : coefficient de partage du transporteur libre (–)

De ces réactions, il est facile de retrouver l'équation 2.27.

Parmi les transporteurs les plus connus (valinomycine, trinactine, nonactine) seule la nonactine remplit dans un large éventail de situations les trois conditions ci-haut énumérées. L'utilisation de la valinomycine est à proscrire car les constantes de vitesse de bicouches dopées à la valinomycine sont du même ordre de grandeur (Knoll & Stark, 1975); ce transporteur ne remplit donc pas la condition ii). Alors que pour la trinactine, il est extrêmement difficile d'atteindre l'équilibre, que l'on ajoute le transporteur via la phase lipidique ou via la phase aqueuse (Hladky, 1979). Elle ne remplit pas, quant à elle, la

condition iii) . La nonactine semble donc le transporteur idéal d'autant plus que l'on peut depuis quelques années se la procurer commercialement.

La nonactine est un antibiotique de la famille des macrotétralides. Ces molécules produites par différentes espèces du genre *Streptomyces* sont constituées de quatre anneaux tétrahydrofuranne liés par des liens ester en un cycle composé de 32 atomes de carbone. La structure chimique de la nonactine est donnée à la **figure 2.10**. L'analyse cristallographique de la molécule et de son complexe (voir **figure 2.11**) montre que de petits déplacements de quelques angles de torsion suffisent à la molécule pour lier l'ion métallique (Grell & coll., 1975). La nonactine est reconnue pour transporter sélectivement l'ion potassium. Ainsi, à concentration égale, la nonactine liera 25 000 ions K^+ pour 175 ions Na^+ pour 1 ion Li^+ (Hansen, 1978). Différentes caractéristiques de la nonactine apparaissent au tableau 2 :

Tableau 2
Caractéristiques principales de la nonactine

Masse moléculaire :	736,95 u
Dimensions :	1,7 x 1,7 x 0,85 nm
Rayon moyen :	0,63 nm
Stoichiométrie de complexation :	1:1
Liens de coordination :	8 (cubique)
Distance métal-O :	0,27 - 0,29 nm
Sélectivité :	$K^+ > Rb^+ \gg Cs^+ > Na^+ \gg Li^+$

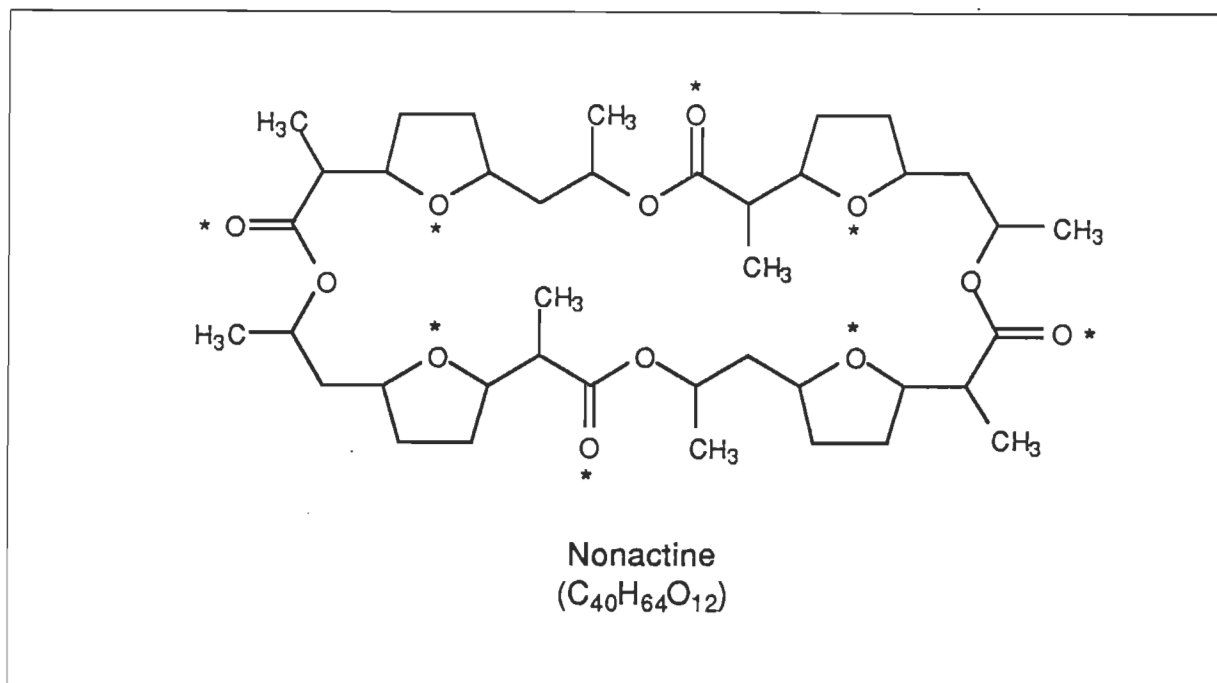


Figure 2.10. – Structure de la nonactine. Les atomes d'oxygène marqués d'un astérisque participent à la formation des liens avec le cation K^+ .

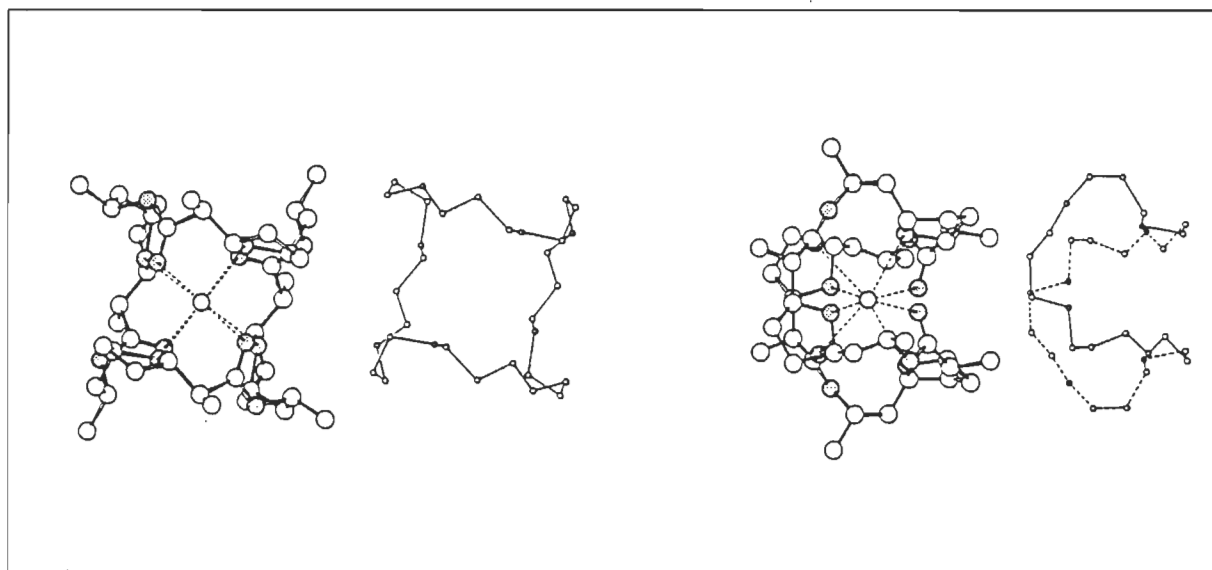


Figure 2.11. – Structure cristalline du complexe nonactine- K^+ . Les liaisons entre les atomes d'oxygène et l'ion K^+ sont ici représentées en traits pointillés. (Tiré de Kilbourn & coll., 1967).

2.3 Approches théoriques du transport ionique

Les modèles cinétiques, dont il fut question à la section précédente, sont constitués d'une série de réactions formellement identiques, et ce, puisque ces réactions ne font appel à aucune approche fondamentale particulière. Il est courant d'exprimer la conductance limite à tension nulle ou encore le taux de renouvellement (« turnover ») du transporteur en fonction des seules constantes de réaction. Mais cette façon de voir ne mène guère à une compréhension plus fine des phénomènes.

La prise de mesures courant-tension nous force, par contre, à poser des constantes de réaction qui dépendent de la tension et ainsi à examiner comment une variable fondamentale, comme le champ électrique, régit le mécanisme du transport. Un support théorique, autre que la description du mécanisme général, devient toutefois nécessaire. Les prochaines sections porteront sur les différentes théories utilisées pour modéliser la translocation voltage-dépendant du complexe nonactine- K^+ au travers d'une bicouche phospholipidique.

2.3.1 Survol des approches théoriques

Nous distinguons généralement deux approches: celle de Nernst-Planck (« continuum approach ») et l'approche d'Eyring (« reaction rate approach », « jump approach »). La première présuppose une diffusion classique du type marche aléatoire dans un milieu continu et, en général, homogène. La deuxième approche repose sur un modèle de diffusion par sauts, modèle développé à l'origine pour calculer la vitesse des réactions chimiques. Selon cette description, l'ion sauterait (« diffuserait ») d'un endroit à un autre en franchissant une haute barrière de potentiel, bien localisée.

Peut-on utiliser ces modèles de diffusion pour décrire la diffusion ionique au travers de membranes biologiques ? Peut-on traiter la membrane, d'une épaisseur d'environ 5 nm, comme un milieu continu et homogène (approche de Nernst-Planck) ? Peut-on la traiter par une ou une série de barrières d'activation s'opposant au passage des ions (approche d'Eyring) ? Un modèle de diffusion serait-il meilleur que l'autre ? La première approche quoique nécessitant la connaissance du potentiel en tout point à l'intérieur de la bicouche

(hauteur et forme de la barrière de potentiel) nous semble conceptuellement plus proche de la réalité physique membranaire. Quant à la seconde, plus grossière (seule la hauteur maximale de la barrière compte), elle apparaît à long terme plus restrictive (nous le verrons à la fin du chapitre). L'approche d'Eyring se révèle plus maniable (ajouts de paramètres), et plus aisément traitable sur le plan mathématique que celle de Nernst-Planck. De fait, chacune a ses tenants et cela se justifie car une approche semble bien fonctionner pour tels types de phénomènes alors que l'autre semble plus indiquée en d'autres circonstances (de Levie, 1978). Deux revues, celles de Levitt (1986) et Cooper & coll. (1985), font le point sur l'état de santé de ces modèles. Il y est question aussi de leur domaine d'application et des mariages possibles entre les deux théories. Une nouvelle approche stochastique du transport ionique, la dynamique brownienne, est aussi exposée par Cooper & coll. (1985).

Dans le cadre plus spécifique de la conductance médiée par des transporteurs, les deux approches, celles de Eyring et de Nernst-Planck, furent utilisées. Cela demeure vrai aussi dans le cadre encore plus spécifique de la translocation d'un transporteur chargé au travers d'une barrière de potentiel trapézoïdale (la forme de barrière choisie pour notre étude). L'approche de Nernst-Planck fut privilégiée par Hall & coll. (1973), Hladky (1974), Krasne & Eisenman (1976) et Schoch & coll. (1979), alors que celle de Eyring le fut par Hall & Latorre (1976), Melnik & coll. (1977), Hansen (1978) et Donavan (1979). Signalons que, sur une vingtaine d'articles publiés à ce jour - et dans lesquels des résultats expérimentaux furent traités -, un seul est consacré à la comparaison des deux théories (van Dijk & de Levie, 1985) et seulement dans le cas particulier d'un trapèze symétrique. Aucune étude, expérimentale ou théorique, ne fut faite dans le cas d'un trapèze asymétrique. Ce travail vise à combler cette importante lacune.

2.3.2 Approche de Nernst-Planck

2.3.2.1 Dérivation de l'équation de Kramers

Imaginons une particule soumise à une force externe F_e constante agissant selon une direction privilégiée et se déplaçant dans un milieu visqueux. La particule devant déplacer les molécules du fluide, elle sera donc soumise à une force de frottement F_f s'opposant à son mouvement. L'on peut poser, en première approximation, cette force égale à $-fv$:

$$F_f = - f v$$

- F_f : force de frottement (N)
 f : coefficient de friction ($\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$)
 v : vitesse de la particule ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

La particule est donc soumise à une force totale égale à $F_e + F_f$:

$$F_T = F_e - f v$$

Après un temps de l'ordre de $4 f/m$, où m est la masse de la particule en kg, la particule atteint un état stationnaire où sa vitesse devient constante. Cette vitesse est donnée par :

$$v = F_e / f = u F_e$$

- v : vitesse stationnaire de la particule ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
 u : mobilité mécanique de la particule ($\text{s}\cdot\text{kg}^{-1}$)

La mobilité peut être reliée, via la relation d'Einstein, au coefficient de diffusion de la particule dans le milieu considéré :

$$D = u k T$$

- D : coefficient de diffusion de la particule ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)

Le coefficient de diffusion est une quantité inhérente au système considéré, alors que la mobilité spécifie la "réponse" du système à l'action d'une force externe.

Intéressons-nous maintenant à un ensemble de particules distribuées de manière homogène dans le milieu et se déplaçant toutes à la même vitesse v sous l'influence de F . La quantité de particules traversant une surface A perpendiculaire à la direction du mouvement, pendant un temps dt , est égale au nombre de particules contenues en amont dans un parallélépipède d'épaisseur $v dt$ et de surface A . Cette quantité est égale au produit $v dt A C$ où C est la concentration de particules dans le volume considéré. Le flux de particule J est donné par le produit $C v$. Si nous avons des particules de différentes espèces et que nous utilisons les quantités molaires, nous aurons :

$$J_i = C_i v_i$$

- J_i : flux de particules i selon la direction du mouvement ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
 C_i : concentration de particules i ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)
 v_i : vitesse stationnaire des particules i ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)

Pour la suite du développement, nous supposons que le flux de particules n'affecte pas (état stationnaire idéal) ou peu (état quasi-stationnaire) les concentrations de particules. Mathématiquement, nous aurons donc $\partial_t C_i = \partial_t J = 0$.

Comme tantôt, la vitesse stationnaire est donnée par :

$$v_i = (u_i / N_A) \cdot F_e = m_i \cdot F_e$$

- u_i : mobilité mécanique de la particule i dans le milieu ($\text{s} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 m_i : mobilité mécanique molaire de la particule i dans le milieu ($\text{mol} \cdot \text{s} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 N_A : nombre d'Avogadro ($\approx 6,022\,045 \cdot 10^{23}$ molécules $\cdot \text{mol}^{-1}$)
 F_e : force externe ($\text{N} \cdot \text{mol}^{-1}$)

et le coefficient de diffusion de la particule i par :

$$D_i = m_i RT$$

où R et T ont leur signification habituelle. Les relations précédentes permettent de relier le flux de particules J_i à la force externe agissant sur celles-ci, mais quelle est cette force ?

Premièrement, oublions la distinction entre force externe et force interne. Ces distinctions sont arbitraires et nous garderons le symbole F pour désigner la force résultante agissant sur une mole de particules. Deuxièmement, la force étant égale en mécanique classique au gradient de l'énergie potentielle (Sivoukhine, 1982, p.166), il est naturel dans un contexte plus large de la poser égale au gradient du potentiel électrochimique. Rappelons que le potentiel électrochimique est égal à la variation d'énergie libre du système lors d'un transfert d'une mole de matière. Troisièmement, pour des raisons de symétrie (le transport de particules s'effectuant dans une direction donnée, celle de la normale à la membrane), nous considérerons la force nette selon la seule direction x :

$$F = - \partial_x \tilde{\mu}_i (x)$$

où le potentiel électrochimique est donné par l'équation 2.4 (retranscrite ici) :

$$\tilde{\mu}_i (x) = \tilde{\mu}_i^0 (x) + RT \ln C_i (x) + Z_i \mathfrak{F} \psi (x)$$

Nous avons donc :

$$F = - \partial_x \tilde{\mu}_i^0 (x) - RT \partial_x \ln C_i (x) - Z_i \mathfrak{F} \partial_x \psi (x)$$

Cette équation cache deux forces: une force "diffusionnelle" donnée par le second terme et une force électrique donnée par le troisième terme. La première origine d'un gradient de concentration, la seconde, d'un champ électrique. La première "pousse" les particules d'une région concentrée vers une région moins concentrée (permettant au système d'accroître son entropie), la seconde "dirige" les particules suivant les lignes du champ électrique et dans une direction donnée par le signe de la particule. Reste le premier terme, le potentiel électrochimique standard. Celui-ci peut être vu, si nous avons l'assurance que deux seules forces seulement agissent sur les particules, comme le potentiel électrochimique d'un état de référence, le zéro d'une échelle; ou encore, si la situation est le moins complexe, comme un terme regroupant toutes les autres contributions possibles à l'énergie libre de la mole de particules. Nous reviendrons sur ce point plus loin. Pour l'instant, posons que ce potentiel standard varie très peu avec la distance. Le flux de particules i peut alors s'écrire comme :

$$J_i = - D_i \left[\partial_x C_i (x) + C_i (x) Z_i \partial_x \varphi (x) \right] \quad [2.28a]$$

où $\varphi (x)$ est le potentiel électrique normalisé à une position x . Cette équation constitue la forme la plus commune de l'équation de Nernst-Planck. Si le système ne comprend qu'une seule espèce chargée et que le signe de sa charge est de $+1$, l'équation de Nernst-Planck devient :

$$J = - D \left[\partial_x C(x) + C(x) \partial_x \varphi(x) \right] \quad [2.28b]$$

En tenant compte de l'identité suivante :

$$\partial_x [C(x) e^{\varphi(x)}] = e^{\varphi(x)} [\partial_x C(x) + C(x) \partial_x \varphi(x)]$$

l'équation 2.28b peut être facilement intégrée selon x . Procédons à cette intégration entre les deux points $x = 0$ et $x = d$:

$$\int_0^d J e^{\varphi(x)} dx = - \int_0^d D \partial_x [C(x) e^{\varphi(x)}] dx$$

À l'état stationnaire nous avons $\partial_t C = 0$ et, vu l'équation de continuité $\partial_x J = -\partial_t C$ (faisant état du principe de conservation de masse), il vient $\partial_x J = 0$. Si l'on considère que le coefficient de diffusion ne varie pas entre $x = 0$ et $x = d$, le flux de particules s'écrit après intégration comme :

$$J = - \frac{D [C(d) e^{\varphi(d)} - C(0) e^{\varphi(0)}]}{\int_0^d e^{\varphi(x)} dx} \quad [2.29a]$$

Cette équation est connue sous le nom d'équation de Kramers. Sa dérivation peut être retrouvée dans Sten-Knudsen (1978).

Appliquons maintenant l'équation de Kramers au transport d'ions K^+ médié par la nonactine au travers d'une membrane d'épaisseur d . Le système comprend donc trois milieux: la membrane et les deux phases aqueuses. Puisque le coefficient de diffusion de l'ion dans la phase aqueuse est de plusieurs ordres de grandeur plus grand que celui du complexe dans la membrane, le problème se ramène à l'étude du mouvement du complexe nonactine- K^+ au travers de la membrane. L'étape de translocation étant l'étape limitante du processus, l'étude revient tout juste à l'électrodifusion d'une substance chargée dans un milieu donné (la membrane) entre un point $x = 0$ et un point $x = d$; ces points correspondant aux endroits où se localisent les complexes près des interfaces. La mesure du flux de complexes s'effectuant selon la direction x , nous avons :

$$J = - \frac{D^M [C^M(d) e^{\phi^M(d)} - C^M(0) e^{\phi^M(0)}]}{\int_0^d e^{\phi^M(x)} dx} \quad [2.29b]$$

- J : flux de complexes au travers de la membrane ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
 D^M : coefficient de diffusion du complexe à l'intérieur de la membrane ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
 C^M : concentration de complexes à un point x à l'intérieur de la membrane ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)
 ϕ^M : potentiel normalisé à une position x à l'intérieur de la membrane (-)
 d : distance sur laquelle l'étape de translocation s'effectue (m)

Les indices supérieurs M font référence au milieu membranaire mais puisqu'un seul milieu est mis en cause nous laisserons tomber cet indice par souci de clarté.

Éclaircissons maintenant le sens du potentiel ϕ . S'agit-il du potentiel électrique appliqué ou du potentiel total ϕ' apparaissant à l'équation 2.25b ? Nous pouvons résoudre le dilemme en nous rendant compte que la variation du potentiel standard selon x correspond, si on la rend sans dimension, au potentiel ϕ défini à la même équation 2.25. Si l'on redérive l'équation de Kramer avec ce "potentiel standard", variant selon x , nous nous retrouvons en 2.29 avec un potentiel ϕ tenant compte des deux contributions. Le ϕ de l'équation 2.29 est donc égal, selon qu'il existe un champ électrique extérieur ou non, aux potentiels ϕ ou ϕ' définis précédemment.

Prenons le cas général où nous appliquons un champ électrique extérieur (différence de tension v) :

$$J(v) = - \frac{D [C(d) e^{\phi'(d)} - C(0) e^{\phi'(0)}]}{\int_0^d e^{\phi'(x)} dx} \quad [2.30]$$

Du flux de particules chargées, il est facile de connaître le courant traversant une membrane d'aire A^M :

$$I(v) = Z \mathfrak{S} A^M J(v) \quad [2.31]$$

- I : courant traversant la membrane à une tension v (A)
 Z : valence du complexe traversant la membrane (-)
 A^M : aire de la membrane (m^2)

La surface de la membrane étant approximativement constante lors d'une même expérience, le courant I est proportionnel au flux J . Et si l'on utilise le courant spécifique (défini comme le courant divisé par la surface), la seule information supplémentaire que nous fournit le courant est la charge de la particule. Si l'on connaît celle-ci (dans notre cas, elle est de +1 charge élémentaire), on peut indistinctement utiliser les termes courant ou flux.

Passons maintenant au coeur de notre propos, au coeur de l'équation 2.30. L'on peut y voir que toute l'information concernant le profil de la barrière de potentiel se retrouve au dénominateur. Nous voyons aussi que le flux (le courant) sera d'autant plus faible que $\phi(x)$ sera élevé; et que la connaissance précise du flux nécessite la connaissance précise de $\phi(x)$. Mais peut-on connaître précisément $\phi(x)$ de la courbe courant-tension ?

2.3.2.2 Procédés d'inversion de la courbe I-V

À une barrière de potentiel donnée, on peut associer une et une seule courbe I-V. Mais l'inverse n'est pas nécessairement vrai: à une courbe I-V expérimentale donnée, nous pouvons associer une infinité de barrières de potentiel de formes diverses (Andersen & Fuchs, 1975; Ginsburg & Noble, 1976), à moins, toutefois, que la courbe expérimentale ne soit infiniment précise (Attwell & Jack, 1978, 1979). Il devient alors possible dans ce cas d'extraire d'une courbe I-V un profil, - et un seul profil -, de potentiel.

La méthode "d'inversion" de la courbe I-V d'Attwell et Jack nécessite la détermination des dérivées de la courbe I-V. Plus celles-ci seront d'ordre supérieur, plus la reconstruction du profil sera précise. Grosso modo, les auteurs affirment qu'à la $n^{\text{ème}}$ dérivée, nous pouvons résoudre des finesses sur le profil de taille d/n . La méthode n'est donc vraiment applicable que si nous déterminons les dérivées jusqu'à l'ordre 6, tout au moins. Les quelque peu bruyantes courbes expérimentales enregistrées jusqu'ici ne permettent malheureusement pas un tel exercice. Comme le mentionnent Attwell & Jack (1979): "*En pratique,*

l'imprécision expérimentale limite grandement l'information que l'on peut tirer d'une courbe I-V ". On peut toutefois rendre le problème moins impérieux en effectuant, comme le suggèrent des auteurs, une régression polynomiale de la courbe expérimentale puis une dérivation numérique de la courbe lissée. Mieux encore, si l'on mesure simultanément la courbe I-V, sa première et sa seconde dérivée, et que l'on calcule ensuite numériquement les dérivées d'ordre supérieur. Nous triplerons ainsi du même coup les exigences expérimentales tout en nous permettant d'accéder à des "n" plus grands encore.

La procédure d'Attwell et Jack n'a jamais, à notre connaissance, été utilisée (elle est passablement rébarbative, il faut le souligner). Les gens préfèrent choisir une fonction $\phi(x)$ qui leur semble a priori la plus raisonnable. Il ne s'agit pas de choisir un profil compliqué avec un grand nombre de variables; non seulement l'approximation par la fonction présumée perdrait de sa signification mais la signification physique de ces variables pourrait causer aussi problème.

2.3.2.3 Choix du profil de la barrière de potentiel

En 1973, Hall & coll. supposèrent un profil symétrique cosinusoidal. Ce profil, apparaissant à la **figure 2.12**, est caractérisé par trois variables: ϕ_0 , $\Delta\phi$, et α . En "inversant" les courbes I-V de films lipidiques noirs de PE de *E. coli* dopés à la nonactine, Hall & coll, obtinrent un profil où $\Delta\phi$ est voisin de zéro, un profil quasi-trapézoïdal (voir le résultat à la **figure 2.13**). Par la suite, d'autres chercheurs approximèrent la barrière de potentiel à un trapèze: citons Hladky (1974), Schoch & coll. (1979), Gliozzi & coll. (1983), Van Dijk & De Levie (1985) et Chernomordik & coll. (1984).

Andersen & Fuchs (1975), étudiant la conductance de l'ion TPB⁻ au travers de films noirs de PE formés au décane (barrière symétrique), préférèrent quant à eux utiliser une barrière calculée à partir de l'énergie de Born et des forces images. Les auteurs firent l'hypothèse que l'adsorption de l'ion TPB⁻ se fait en deçà des plans de dipôles ($\delta_1 > d_1$) et qu'ainsi, si l'on corrige les concentrations interfaciales du TPB⁻ en tenant compte du potentiel dipolaire ψ_D , il n'est plus nécessaire d'inclure ce potentiel dans la barrière de translocation. Cela n'est strictement vrai toutefois que si la membrane est symétrique car le champ dipolaire à l'intérieur de la membrane s'annule alors.

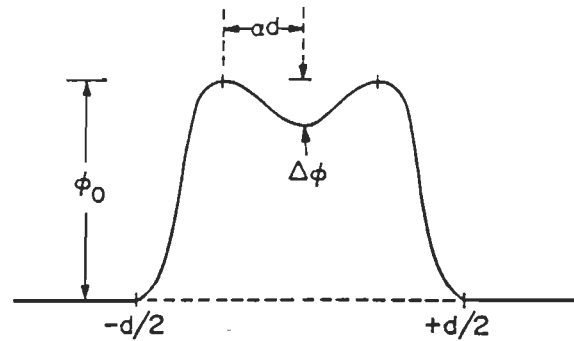


Fig. 7. The physical meaning of the parameters in Eq. (28). ϕ_0 is the height of the inflection point, α measures the position of the inflection point and corresponds roughly to $(1 - \pi)/2$ for the trapezoidal barrier of Fig. 2. $\Delta \phi$, which can be either positive or negative, allows either a peak or a dip at the center of the membrane. This form was found to give the most satisfactory solution to the integral equation [Eq. (27)] for $S(u)$

Figure 2.12. – Modèle de barrière utilisé par Hall & coll. pour extraire le profil d'énergie potentielle de bicouches symétriques. (Tiré de Hall & coll., 1973).

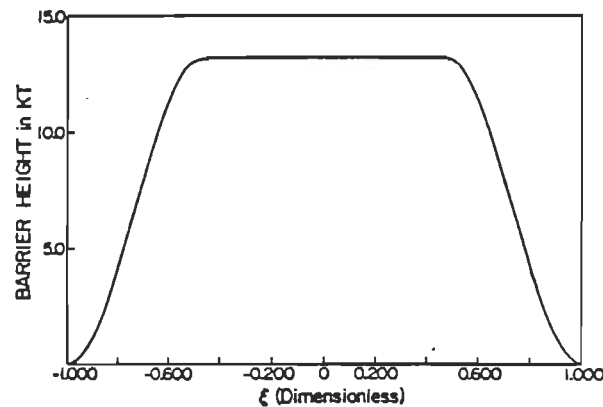


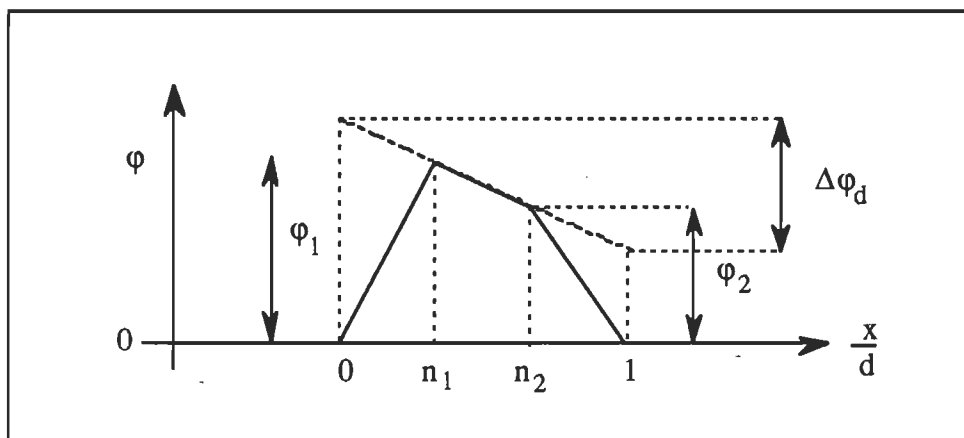
Fig. 8. The barrier shape as determined by the solution of Eq. (27). The height of the barrier is *not* measured accurately, but the flat top and position of the corners are sensitive to the experiment and are accurately determined. The values of the parameters are: $\phi_0 = 13.2$ kT, $\Delta \phi = 0.02$ kT, $\alpha = 0.47$. (An $\alpha = 0.47$ corresponds roughly to a value of $\pi = 0.27$ in Fig. 2)

Figure 2.13. – Barrière de potentiel extraite de courbes I-V provenant de films noirs de PE d'origine bactérienne. (Tiré de Hall & coll., 1973).

Lapointe & Laprade (1982) utilisèrent aussi une barrière dérivée des forces images pour expliquer les différentes cinétiques de translocation de la nonactine dans des BLM formées à partir de différents solvants. Aucune allusion ne fut toutefois faite, dans ce cas, au potentiel dipolaire, pas plus qu'à la présence possible de potentiels de distribution.

Compte tenu de la difficulté de calculer a priori la barrière d'énergie, compte tenu que cette barrière peut être grossièrement approchée par un trapèze, compte tenu surtout des résultats obtenus par Hall & coll.(1973), nous opterons, pour des raisons de simplicité et, dans une certaine mesure, de "visibilité", pour l'approximation trapézoïdale.

La barrière de potentiel trapézoïdale se caractérise par cinq variables: la hauteur aux deux coins du trapèze (ϕ_1 et ϕ_2), la position de ces deux coins (n_1 et n_2) et l'épaisseur (d). On pourrait également la caractériser en fonction de ϕ_1 , de la différence entre la hauteur des coins, $\Delta\phi$ (défini comme $\phi_2 - \phi_1$), de n_1 , de la différence entre la position des coins, Δn , et de d . On pourrait encore utiliser, au lieu de $\Delta\phi$, la différence de hauteur rapportée sur toute l'épaisseur d , $\Delta\phi_d$ (voir dessin suivant), sans y changer quoi que ce soit.

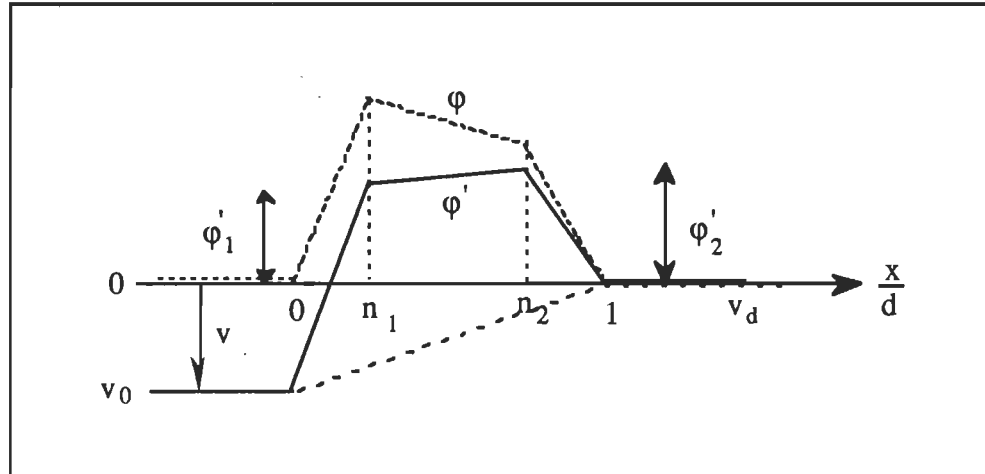


La fonction $\phi(x)$ peut ainsi être décrite selon l'expression 2.32 :

$$\varphi(x) = \begin{cases} \frac{\varphi_1}{n_1} \cdot \frac{x}{d} & \frac{x}{d} \in [0, n_1] \\ \left(\frac{\Delta\varphi}{\Delta n}\right) \cdot \frac{x}{d} + \varphi_1 - n_1 \cdot \left(\frac{\Delta\varphi}{\Delta n}\right) & \frac{x}{d} \in [n_1, n_2] \\ \left(\frac{\varphi_2}{n_2 - 1}\right) \cdot \left(\frac{x}{d} - 1\right) & \frac{x}{d} \in [n_2, 1] \end{cases} \quad [2.32]$$

- φ_1 : hauteur de la barrière de potentiel à la position $x = n_1 d$ (-)
 φ_2 : hauteur de la barrière de potentiel à la position $x = n_2 d$ (-)
 $\Delta\varphi$: différence de potentiel entre les coins du trapèze ($\equiv \varphi_2 - \varphi_1$)
 n_1 : position du premier coin du trapèze (-)
 n_2 : position du second coin du trapèze (-)
 Δn : distance normalisée entre les deux coins ($\equiv n_2 - n_1$)

où $\Delta\varphi / \Delta n$ est justement $\Delta\varphi_d$. Si nous appliquons une différence de potentiel v , le trapèze se “déformera” tel que représenté sur l’encadré qui suit :



et la nouvelle barrière de potentiel φ' sera donnée par l'équation 2.33 :

$$\varphi'(x) = \begin{cases} \frac{\varphi_1' - v_0}{n_1} \cdot \frac{x}{d} + v_0 & \frac{x}{d} \in [0, n_1] \\ \left(\frac{\Delta\varphi'}{\Delta n} \right) \cdot \frac{x}{d} + \varphi_1' - n_1 \cdot \left(\frac{\Delta\varphi'}{\Delta n} \right) & \frac{x}{d} \in [n_1, n_2] \\ \frac{\varphi_2' - v_d}{(n_2 - 1)} \cdot \frac{x}{d} + \frac{n_2 v_d - \varphi_2'}{(n_2 - 1)} & \frac{x}{d} \in [n_2, 1] \end{cases} \quad [2.33]$$

2.3.2.4 Intégration de l'équation de Kramer pour un profil trapézoïdal

L'intégration de la barrière de potentiel se fait en trois parties, chacune correspondant en un segment de droite. La primitive de l'exponentielle de $mx + b$ étant égale à cette même exponentielle divisée par m , l'intégration s'effectue sans encombre. Le résultat apparaît en 2.34. Nous y retrouvons au dénominateur les trois termes correspondant à la partie gauche, centrale et droite du trapèze, respectivement.

$$I(v) = \frac{Z S A D d^{-1} (C_0 e^{v_0} - C_d e^{v_d})}{\left[n_1 \left(\frac{e^{\varphi_1} - e^{v_0}}{\varphi_1 - v_0} \right) + \Delta n \left(\frac{e^{\varphi_2} - e^{\varphi_1}}{\Delta\varphi} \right) + (1 - n_2) \left(\frac{e^{\varphi_2} - e^{v_d}}{\varphi_2 - v_d} \right) \right]} \quad [2.34]$$

Il est intéressant de mentionner que cette expression n'a jamais été rapportée dans la littérature. Les auteurs ayant retenu l'approximation trapézoïdale utilisent plutôt une forme tronquée de l'équation 2.34, forme que nous verrons un peu plus loin.

Établissons maintenant notre convention pour le potentiel appliqué. Signalons d'abord que notre appareil pour mesurer le courant est conçu de telle façon que la tension mesurée est celle appliquée du côté *cis* de la membrane alors que le côté *trans* est mis à la terre (voir Chapitre III). Signalons ensuite que nous mesurons un courant positif (de *cis* vers *trans*) lorsque la tension affichée est positive. Si nous prenons finalement, et rien ne nous l'empêche, que le côté *cis* correspond à $x < 0$ et le côté *trans* à $x > d$, nous aurons $v_0 = v$ et $v_d = 0$, où v est la tension affichée. L'équation 2.34 devient donc :

$$I_{NP}(v) = \frac{K_{NP} (e^v - \gamma)}{D(v)} \quad [2.35]$$

- I_{NP} : courant traversant la membrane selon la théorie de Nernst-Planck (A)
 K_{NP} : constante regroupant plusieurs paramètres expérimentaux (A)
 γ : rapport de la concentration de complexes à $x = d$ sur celle à $x = 0$ (-)
 v : potentiel appliqué adimensionnel (-)

avec :

$$K_{NP} = Z \Im A D d^{-1} C_0 \quad \gamma = \frac{C_d}{C_0}$$

$$D(v) = n_1 \left(\frac{e^{\phi_1} - e^v}{\phi_1 - v} \right) + \Delta n \left(\frac{e^{\phi_2} - e^{\phi_1}}{\Delta \phi} \right) + (1 - n_2) \left(\frac{e^{\phi_2} - 1}{\phi_2} \right)$$

$$\phi_{1,2}' = \phi_{1,2} + (1 - n_{1,2}) v \quad \Delta \phi' = \Delta \phi - \Delta n v$$

Le courant dépend ainsi, outre de v , de 6 paramètres: K_{NP} , ϕ_1 , $\Delta \phi$, n_1 , n_2 et γ . Une étude, à la fois graphique et analytique nous permettra de cerner un peu mieux ces paramètres, de les sentir en quelque sorte.

2.3.2.5 Étude analytique de l'expression $I(V)$ selon Nernst-Planck

2.3.2.5.1 Abscisse à l'origine

Examinons d'abord les zéros de l'équation. Nous voyons que le courant s'annule pour tout v si $K_{NP} = 0$ (cas trivial) où si $v = \ln \gamma$. Pour un rapport de concentration, γ , de 0,1, la courbe I-V coupe l'axe des tensions à -59 mV environ. Ce potentiel correspond au potentiel d'inversion (« reversal potential ») bien connu en physiologie. Si le rapport des concentrations est égal à 1, la courbe I-V passe par l'origine.

Le dénominateur est donné par l'intégrale de l'exponentielle de $\phi(x)$. La fonction exponentielle étant toujours positive, le dénominateur $D(v)$ ne peut s'annuler. La fonction $I(v)$ ne montre donc pas d'indétermination du type 0 / 0, mais ce n'est pas le cas de la fonction au dénominateur $D(v)$.

2.3.2.5.2 Levée des indéterminations

Le dénominateur $D(v)$ comprend trois termes devenant indéterminés lorsque les termes sous les fractions s'annulent. L'indétermination la plus susceptible de se produire est celle liée au terme central ($\phi_2' = \phi_1'$). Elle survient lorsque $v = \Delta\phi_d$. Nous pouvons la lever comme les deux autres en réécrivant $D(v)$ de la façon suivante :

$$D(v) = n_1 e^v \left(\frac{e^{\phi_1' - v} - 1}{\phi_1' - v} \right) + \Delta n e^{\phi_1'} \left(\frac{e^{\Delta\phi} - 1}{\Delta\phi} \right) + (1 - n_2) \left(\frac{e^{\phi_2} - 1}{\phi_2} \right) \quad [2.36]$$

Nous avons ici trois termes de la forme :

$$\theta(x) = (e^x - 1) x^{-1}$$

La limite de cette fonction lorsque x tend vers 0 peut être évaluée à l'aide de la règle de l'Hôpital (Piskounov, 1985, p.155). Elle est égale à 1. Pour des arguments de θ petits, nous pouvons utiliser la formule tronquée $\theta(x) \approx 1 + x/2 + x^2/6$, formule utile pour la programmation. Les indéterminations étant levées nous avons procédé à la mise en graphique de la relation $I(v)$. À la **figure 2.14** apparaît une courbe I - V pour une barrière trapézoïdale symétrique, dans des conditions symétriques de concentration ($\gamma = 1$). La courbe obtenue est symétrique et peut être bien lissée par une cubique. À la **figure 2.15**, nous avons une courbe générée à partir d'une barrière trapézoïdale où le coin 1 (cis) est de 60 mV plus élevé que le coin 2 (trans). La courbe est asymétrique et, cette fois-ci, une courbe de degré supérieur est nécessaire pour bien lisser la courbe. Quant à l'asymétrie, elle est bien dans le sens escompté. Nous retrouvons le plus fort courant dans le quadrant III, c. à d. lorsque le courant passe du côté du plus faible potentiel vers le côté de plus haut potentiel. Le sens de cette asymétrie origine du fait que la voltage-dépendance du dénominateur est plus grande que celle du numérateur. La situation est inversée pour $\Delta\phi > 0$ (côté 2 plus élevé que côté 1) : le courant le plus fort se retrouve alors dans le quadrant I.

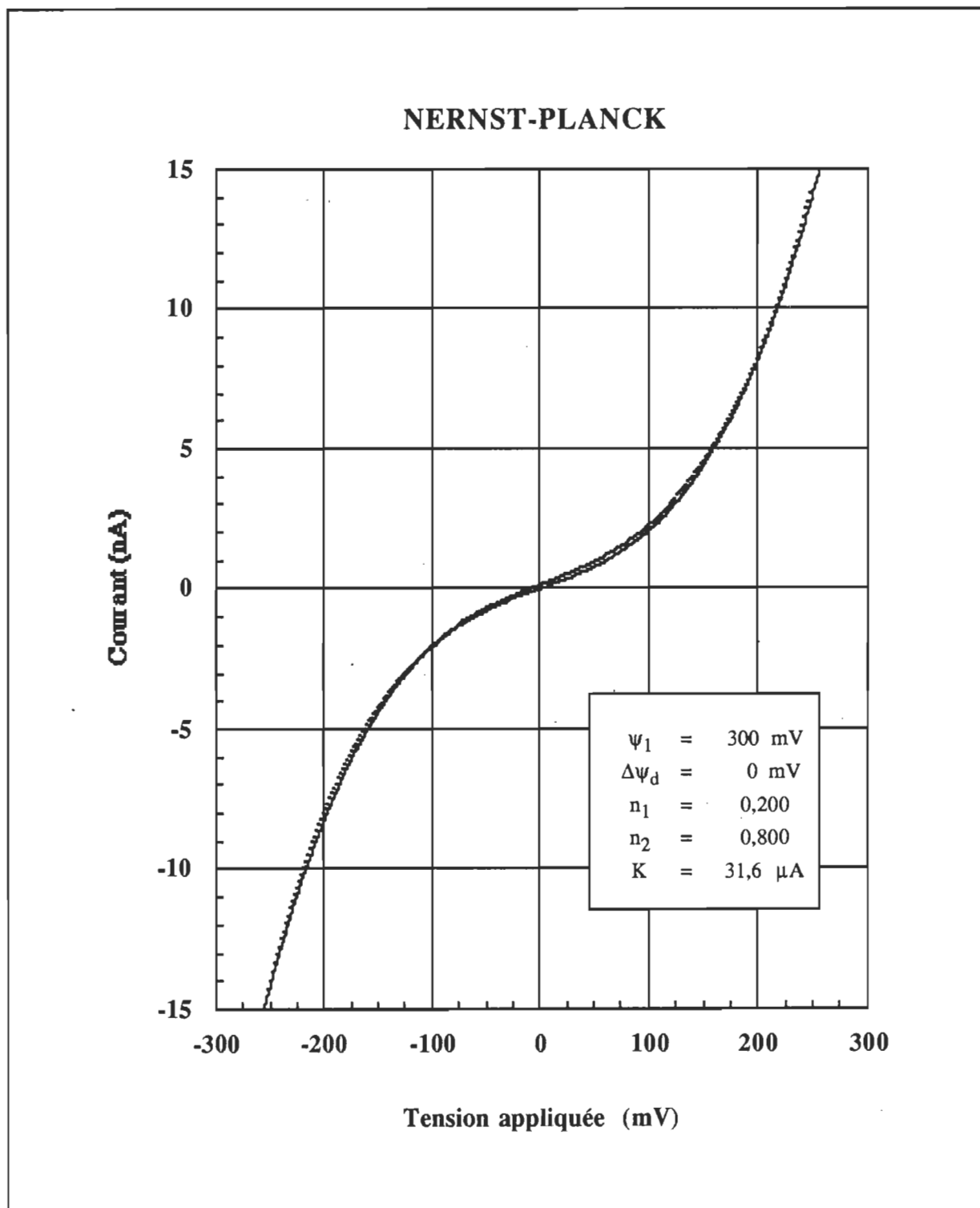


Figure 2.14. – Courbe I-V d'une barrière de potentiel trapézoïdale symétrique prédite par la théorie de Nernst-Planck. 250 points furent calculés à partir de l'équation 2.35 et mis en graphique. La courbe apparaissant en trait continu est une courbe de troisième degré approximant le mieux les 250 points "théoriques". Les paramètres caractérisant la barrière sont donnés dans l'encadré.

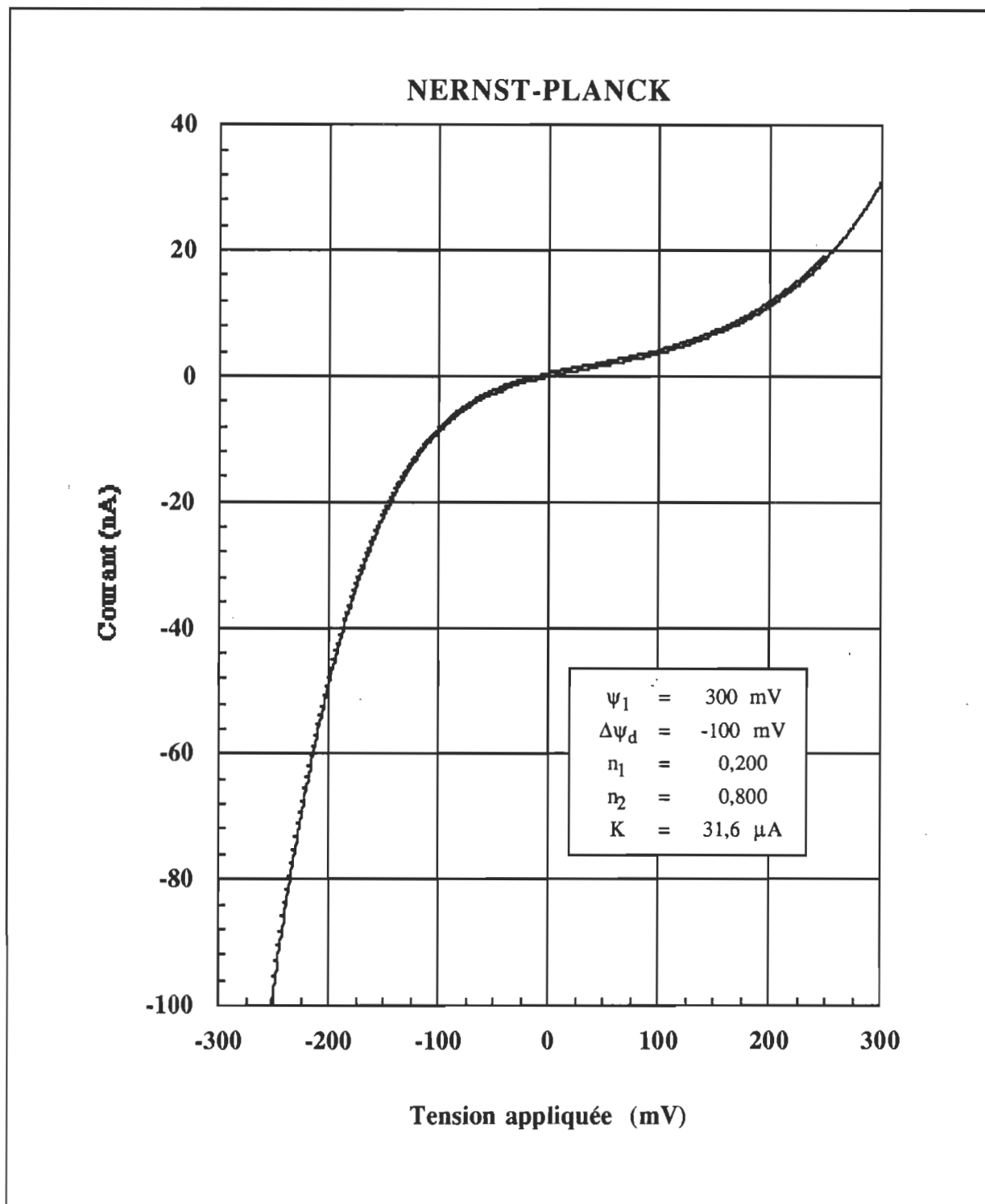


Figure 2.15. – Courbe I-V d'une barrière de potentiel trapézoïdale asymétrique prédite par la théorie de Nernst-Planck. 250 points furent calculés à partir de l'équation 2.35 et mis en graphique. Les 250 points sont ici approximés par un polynôme de degré 5 (trait continu). Les paramètres caractérisant la barrière sont donnés dans l'encadré.

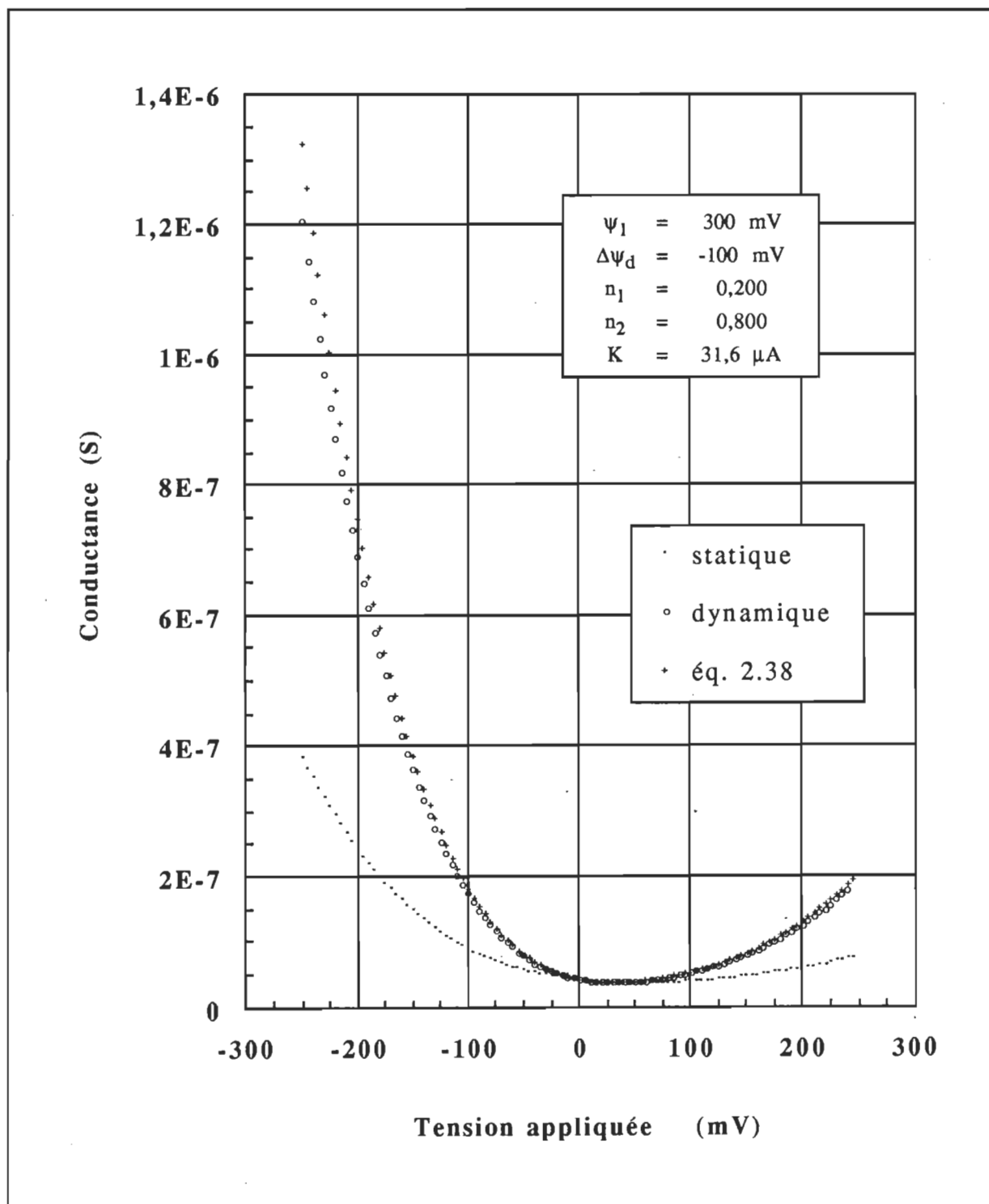


Figure 2.16. – Graphique de la conductance (dynamique, statique et approchée) en fonction de la tension V , selon l'approche de Nernst-Planck. Les paramètres de la barrière asymétrique sont fournis dans l'encadré placé en haut de la figure. (Voir texte pour de plus amples informations).

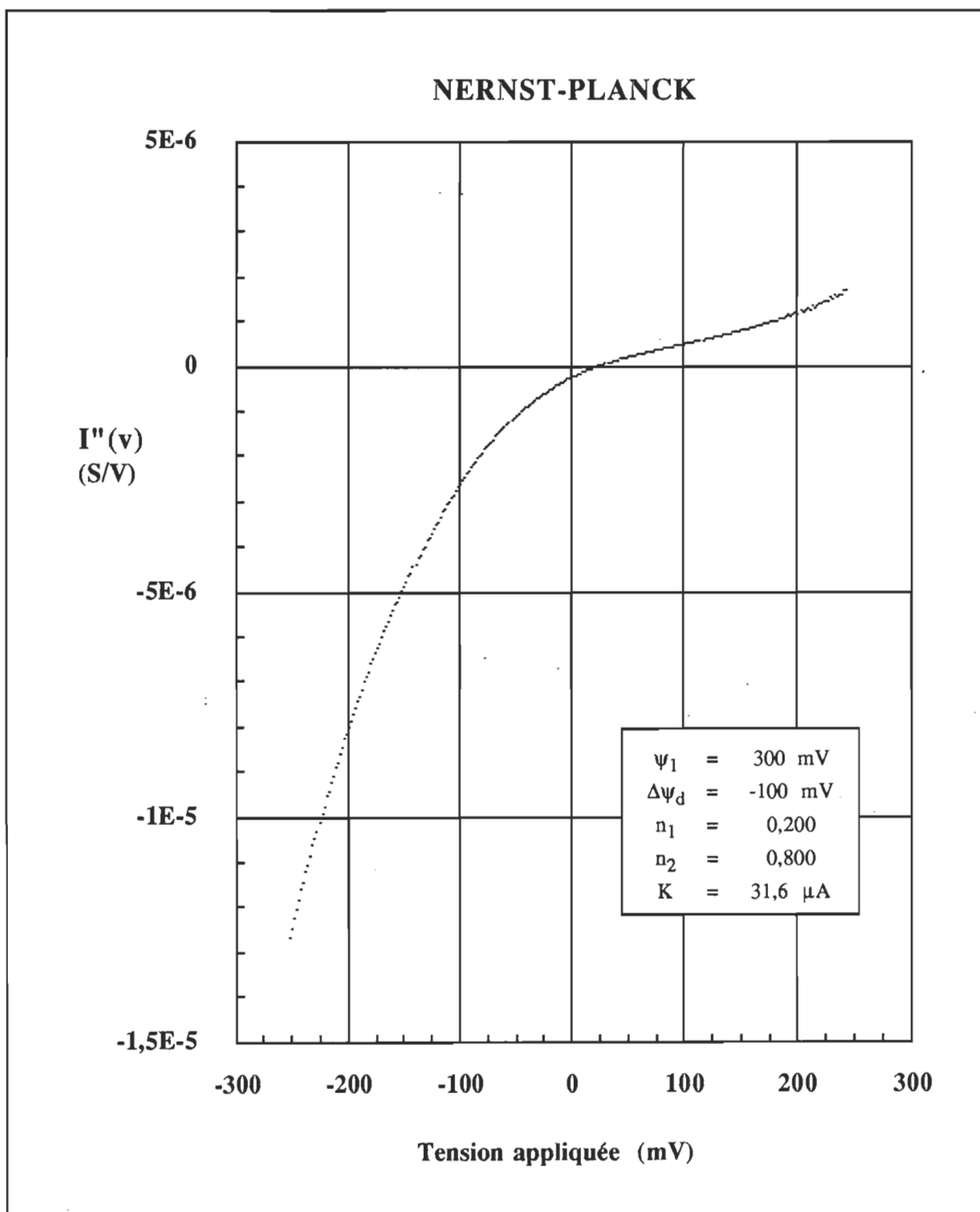


Figure 2.17. – Courbe de seconde dérivée de la fonction $I(V)$ d'une barrière de potentiel trapézoïdale asymétrique (approche de Nernst-Planck). La courbe fut obtenue en différenciant numériquement, à deux reprises, les points apparaissant à la figure 2.15.

Le rapport de rectification dépend de la tension à laquelle on le mesure mais aussi des autres variables γ , des différences $\Delta\phi$, Δn , et dans une moindre mesure, de la valeur des paramètres ϕ_i et n_i . En utilisant l'équation 2.35 nous obtenons pour R :

$$R_{NP}(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) = \left(\frac{\gamma - e^v}{e^{-v} - \gamma} \right) \cdot \frac{D(-v, \Delta\phi, \Delta n)}{D(v, \Delta\phi, \Delta n)} \quad [2.40]$$

De l'équation 2.40 on peut démontrer que R est égal à 1 (courbe symétrique) si et seulement si $\gamma = 1$, $\Delta\phi = 0$ et $n_2 = 1 - n_1$ (barrière trapézoïdale symétrique).

Par définition du rapport de rectification on peut écrire :

$$R_{NP}(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) = R_{NP}(-v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n)^{-1}$$

Nous avons tracé à la **figure 2.18**, le rapport de rectification pour la courbe asymétrique présentée à la figure 2.15. La courbe obtenue est bien de nature hyperbolique.

L'équation 2.40 est intéressante aussi dans la limite où $|v| \gg |\ln \gamma|$. Nous obtenons alors l'équation suivante :

$$R_{NP}(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) = \begin{cases} \gamma^{-1} e^v \cdot \frac{D(-v, \Delta\phi, \Delta n)}{D(v, \Delta\phi, \Delta n)} & v > 0 \\ \gamma e^v \cdot \frac{D(-v, \Delta\phi, \Delta n)}{D(v, \Delta\phi, \Delta n)} & v < 0 \end{cases}$$

qui peut s'écrire sous une forme plus succincte :

$$R_{NP}(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) \underset{|v| \gg |\ln \gamma|}{\sim} \gamma^{-\text{sgn}(v)} e^v \frac{D(-v, \Delta\phi, \Delta n)}{D(v, \Delta\phi, \Delta n)} \quad [2.41]$$

On peut donc définir un nouveau rapport de rectification R^* de la manière suivante :

$$R^*(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) \equiv R(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) \gamma^{\text{sgn}(v)} \quad [2.42]$$

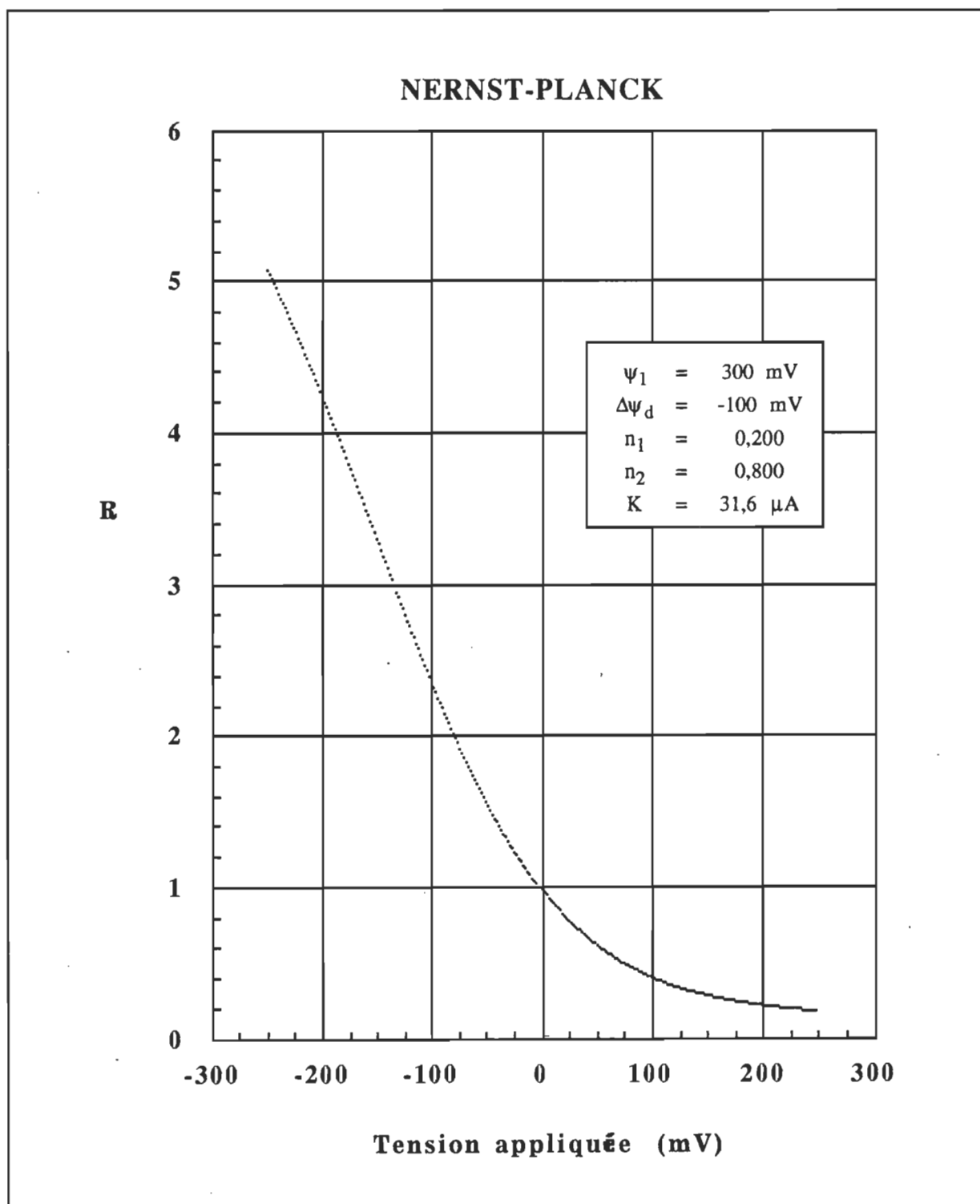


Figure 2.18. – Graphique du rapport de rectification R en fonction de V (approche de Nernst-Planck). Les 250 points furent calculés à partir des couples (I,V) mis en graphique à la figure 2.15.

de sorte que, toujours dans la limite $|v| \gg |\ln \gamma|$, que ce rapport ne dépende plus de γ (équation 2.43) :

$$R_{NP}(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) \underset{|v| \gg |\ln \gamma|}{\sim} \gamma^{-\text{sgn}(v)} e^v \frac{D(-v, \Delta\phi, \Delta n)}{D(v, \Delta\phi, \Delta n)} \quad [2.41]$$

Soulignons, à titre de curiosité, que dans la limite où v tend vers l'infini, et que $\gamma = 1$, le courant devient ohmique (équation 2.44) :

$$I_{NP}(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) \underset{|v| \rightarrow \infty}{\sim} K_{NP} v \cdot \left(\frac{e^v - \gamma}{e^v - 1} \right) \quad [2.44]$$

et le rapport de rectification R redevient 1 peu importe $\Delta\phi$

$$R_{NP}(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) \underset{|v| \rightarrow \infty}{\sim} \gamma^{-\text{sgn}(v)} \quad [2.45]$$

À partir des deux propriétés de R^* suivantes :

$$R_{NP}^*(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) > 1 \Leftrightarrow \text{sgn}(\Delta\phi) = \text{sgn}(v)$$

$$R_{NP}^*(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) = R_{NP}^*(v, \gamma, -\Delta\phi, \Delta n)^{-1}$$

(la première est générale mais la seconde n'est cependant valide que pour $n_2 = 1 - n_1$), nous proposons le paramètre d'asymétrie A suivant :

$$A(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) \equiv R^*(v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n)^{\text{sgn}(\Delta\phi) \cdot \text{sgn}(v)} \quad [2.46]$$

Si l'on substitue à $\Delta\phi$ sa valeur absolue, nous obtenons 2.47 :

$$A(v, \gamma, |\Delta\phi|, \Delta n) = R^*(v, \gamma, |\Delta\phi|, \Delta n)^{\text{sgn}(v)} \quad [2.47]$$

Le nouveau paramètre A ne dépend ni de γ , ni du signe de $\Delta\phi$ et est toujours supérieur à l'unité. Cela est strictement vrai si $v \gg \ln \gamma$ et $n_2 = 1 - n_1$. Nous verrons au chapitre 5 que ces conditions sont respectées pour les courbes I-V que nous avons obtenues expérimentalement.

2.3.3 Approche de Eyring

Le processus d'électrodiffusion peut être formalisé selon une tout autre approche que celle de Nemst-Planck. Il s'agit de l'approche de Eyring. Ce dernier développa, en 1935, une théorie permettant de calculer les vitesses absolues des réactions chimiques, théorie impliquant l'existence d'un complexe activé marquant un état de transition entre les réactifs et les produits de la réaction. La théorie porte le nom de théorie des vitesses absolues, de théorie de l'état de transition ou encore théorie du complexe activé. Nous garderons l'appellation théorie de Eyring du complexe activé ou plus simplement théorie de Eyring.

2.3.3.1 Dérivation sommaire de l'équation de Eyring

Soit une réaction chimique simple menant d'un réactif A à un produit B



La vitesse de production de B est donnée par:

$$v = \vec{k} [A]$$

- v : taux de formation du produit B ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$)
- \vec{k} : constante de vitesse de la réaction de A vers B (s^{-1})
- $[A]$: concentration du réactif A ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$)

À l'équilibre la constante de vitesse peut être reliée à la constante d'équilibre de la réaction, laquelle est donnée par l'équation suivante:

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)$$

K : constante d'équilibre de la réaction (-)

ΔG : différence d'énergie libre de Gibbs entre le produit et le réactif (J•mol⁻¹)

La différence d'énergie libre peut être vue ici comme une différence de potentiel électrochimique entre deux états. Elle détermine le sens de la réaction mais aucunement sa vitesse. Cela amena différents chercheurs à postuler l'existence d'une barrière d'activation dont la hauteur contrôlerait la vitesse du processus. Dans le cas de réactions simples en phase gazeuse, cette barrière peut être tracée à partir des surfaces d'énergie potentielle. On y voit clairement un pic d'activation que les molécules de A doivent franchir pour devenir B. Eyring et ses collègues supposèrent que des molécules appelées complexes activés se trouvent au sommet de ce pic (correspondant en fait à un col sur la surface d'énergie potentielle). L'énergie requise pour les former se dénomme énergie libre d'activation et se note ΔG^\ddagger . Le postulat de base de la théorie de Eyring veut que les molécules de complexes activés et les molécules de réactif soient en équilibre les uns avec les autres.

Nous ne referons pas ici la dérivation complète de la formule de Eyring. Nous pouvons la retrouver dans plusieurs manuels in extenso (Glasstone, Laidler & Eyring, 1941; Laidler & Tweedale, 1971) ou sous une forme succincte (Klein, 1982; Volkenstein, 1985). Nous nous contenterons ici de reproduire deux équations intermédiaires. D'abord l'équation 2.48:

$$v = \frac{kT}{h} [A^\ddagger] \quad [2.48]$$

v : taux de formation du produit B (mol•m⁻³•s⁻¹)

k : constante de Boltzmann (J•K⁻¹)

T : température (K)

h : constante de Planck (J•s⁻¹)

$[A^\ddagger]$: concentration de complexes activés (mol•m⁻³)

qui établit une correspondance entre la vitesse de la réaction et la concentration de complexes, et l'équation 2.49:

$$\vec{k} = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad [2.49]$$

que l'on tire du postulat de base. Mais toutes les molécules à l'état activé, bien qu'ayant la direction et l'énergie souhaitées, ne se transforment pas nécessairement en B. C'est pourquoi on multiplie le membre de droite par un facteur supplémentaire τ compris entre 0 et 1.

$$\vec{k} = \frac{\tau kT}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad [2.50]$$

τ : coefficient de transmission (-)

Le coefficient de transmission vaut 1 si, d'une part, la réaction se produit adiabatiquement, c.à.d si le point caractérisant l'état du système se déplace doucement le long de la surface d'énergie potentielle et si d'autre part, le nombre de collisions (la pression s'il s'agit d'un gaz) est suffisamment élevé(e) pour que les molécules de complexes activés se désactivent en produits plutôt que de "risquer" de revenir à l'état initial (Emanuel & Knorre, 1975).

L'équation 2.50 constitue l'équation de Eyring et l'on peut à partir d'elle, si l'on connaît ΔG^\ddagger , τ , et $[A]$, calculer de manière absolue le taux de formation de B. Malheureusement, le coefficient de transmission est rarement connu et il agit le plus souvent comme un facteur correctif permettant de relier données expérimentales et prédictions théoriques. Pour des réactions en solution, le coefficient de transmission est souvent de l'ordre de 10^{-6} ce qui apporte un sérieux bémol à la théorie, dite des vitesses absolues.

La théorie de Eyring repose sur l'hypothèse d'un équilibre entre complexes activés et molécules de réactifs. Mais si la barrière d'activation devient trop petite, la réaction est trop rapide et il ne peut s'établir d'équilibre entre complexes et réactifs, les molécules de complexe activé disparaissant trop rapidement. L'on s'entend généralement pour affirmer qu'une barrière d'au moins 5 kT est nécessaire pour que l'équilibre soit assuré.

2.3.3.2 Application de la théorie au processus de diffusion

La théorie de Eyring peut en principe être appliquée à tout processus impliquant une réorganisation de la matière. Cela va de la cinétique hétérogène à la relaxation diélectrique. L'un des domaines où elle s'est avérée la plus féconde demeure sans doute celui de la diffusion.

La diffusion d'une particule, que ce soit au sein d'un liquide ou d'un solide, est souvent approchée par des modèles par sauts. Selon ces modèles, la particule saute d'un site (d'un puits de potentiel) à un autre et parcourt ainsi, après un certain temps, une certaine distance selon une direction x . Ces sauts ne sont possibles que si la particule possède l'énergie requise pour franchir une barrière d'activation de hauteur ΔG_D^\ddagger .

2.3.3.3 Cas d'une seule barrière de diffusion

Soit une barrière de diffusion de hauteur ΔG_D^\ddagger séparant deux sites éloignés d'une petite distance λ . Du côté gauche de la barrière, nous avons une concentration $C(x)$ de particules diffusantes et du côté droit une concentration $C(x+\lambda)$. Imaginons un parallélépipède d'une section de 1m^2 et de longueur λ m. Si nous plaçons ce parallélépipède à la position x , il contiendra un nombre $\lambda \cdot C(x)$ de particules et si la fréquence de passage de x à $x+\lambda$ est donné par \vec{k} nous aurons un flux de particules, de la gauche vers la droite, donné par 2.51a:

$$\vec{J} = \vec{k} \lambda C(x) \quad [2.51a]$$

et le flux de droite vers la gauche par 2.51b:

$$\overleftarrow{J} = \overleftarrow{k} \lambda C(x + \lambda) \quad [2.51b]$$

En utilisant la formule de Eyring pour expliciter les constantes de vitesse et en faisant la différence, nous obtenons le flux net de particules diffusant de la gauche vers la droite (équation 2.52):

$$J = \frac{\tau k T}{h} \lambda e^{-\frac{\Delta G_D^\ddagger}{RT}} \left[C(x) - C(x + \lambda) \right] \quad [2.52]$$

Nous avons ici fait l'hypothèse que le coefficient de transmission de la "réaction" de la gauche vers la droite est le même que celui de la droite vers la gauche. Le mécanisme de diffusion étant a priori le même dans les deux cas, cette hypothèse nous apparaît, en première approximation à tout le moins, plausible et raisonnable.

Considérons maintenant la membrane comme une barrière de diffusion des complexes nonactine- K^+ . Donnons lui une hauteur maximale ϕ_{\max} et une épaisseur d . Directement de 2.52, il vient :

$$J = \frac{\tau k T}{h} d e^{-\phi_{\max}^M} [C^M(0) - C^M(d)] \quad [2.53]$$

où l'indice supérieur M réfère au milieu membranaire. En multipliant par $\mathfrak{S}A^M$ (Z étant ici égal à $+1$), nous obtenons l'expression du courant :

$$I = \frac{\mathfrak{S}A^M \tau k T d}{h} \cdot e^{-\phi_{\max}^M} \cdot [C^M(0) - C^M(d)] \quad [2.54]$$

Si nous regroupons les termes et que nous laissons tomber de nouveau les indices M , l'équation 2.54 devient :

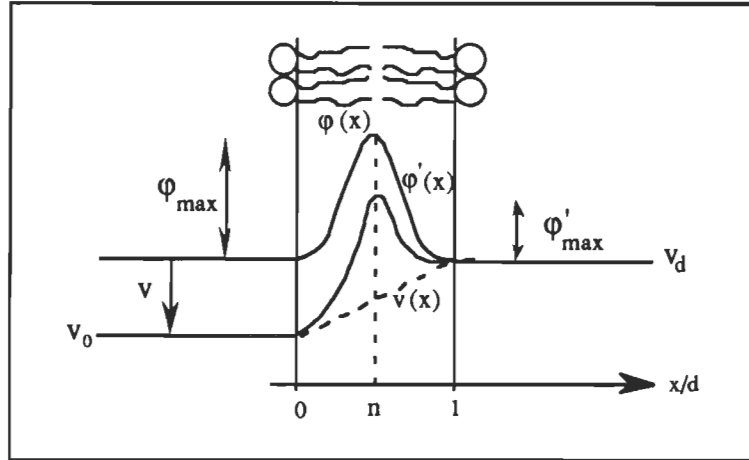
$$I = K_{EY} e^{-\phi_{\max}} (1 - \gamma) \quad [2.55]$$

où
$$K_{EY} = \frac{\mathfrak{S} A \tau k T d C_0}{h} \quad \text{et} \quad \gamma = \frac{C_d}{C_0}$$

Notons que les termes K_{EY} et γ sont toujours positifs.

Appliquons maintenant une différence de potentiel ($v_d - v_0$) de part et d'autre de la barrière. Comme illustré au schéma suivant, la nouvelle barrière est donnée par la somme des potentiels. Si la barrière est suffisamment haute, la position du pic de la barrière, n , ne sera pas modifiée et nous pourrons écrire :

$$\phi_{\max}' = \phi_{\max} + n (v_d - v_0) + v_0 \quad [2.56]$$



La hauteur de barrière que rencontre la particule chargée est donnée par la différence entre la hauteur maximale et la valeur de potentiel à l'interface d'origine. Cette hauteur n'est plus la même lorsqu'une tension est appliquée et si nous avons une concentration égale de l'espèce diffusible de part et d'autre de la barrière, un courant net sera créé. La valeur de ce courant peut être calculée à partir de l'équation 2.57 :

$$I(v) = \frac{K_{EY}}{C_0} \left[C_0 e^{-(\phi_{\max} - \phi'(0))} - C_d e^{-(\phi_{\max} - \phi'(d))} \right] \quad [2.57]$$

Le potentiel ϕ étant considéré nul aux interfaces, l'équation 2.57 devient :

$$I(v) = K_{EY} e^{-\phi_{\max}} (e^{v_0} - \gamma e^{v_d}) \quad [2.58]$$

Et si l'on adopte la même convention de signe que précédemment :

$$I(v) = K_{EY} e^{-\phi_{\max}} (e^v - \gamma) \quad [2.59]$$

avec :

$$\phi_{\max}' = \phi_{\max} + (1 - n) v$$

- I_{EY} : courant traversant la membrane selon la théorie de Eyring (A)
- K_{EY} : constante regroupant plusieurs paramètres expérimentaux (A)
- ϕ_{\max} : hauteur maximale de la barrière de potentiel de diffusion (-)
- n : position du maximum de la barrière (-)
- γ : rapport de la concentration de complexes à $x = d$ sur celle à $x = 0$ (-)
- v : potentiel appliqué du côté cis (-)

Nous pouvons calculer, à partir de cette expression, le rapport de rectification. Pour des tensions excédant largement $\ln \gamma$, nous obtenons :

$$R(v) \underset{|v| \gg |\ln \gamma|}{\sim} \gamma^{-\text{sgn } v} \cdot e^{(2n-1)v} \quad [2.60]$$

Nous remarquons que pour $n=0,5$ et $\gamma=1$, R vaut 1. La courbe I-V est donc symétrique par rapport à l'origine. L'équation 2.60 nous montre aussi que le logarithme de R dépend linéairement de v .

2.3.3.4 Cas d'une barrière trapézoïdale

Nous allons maintenant appliquer la théorie de Eyring à la barrière de potentiel trapézoïdale définie plus haut. Puisque la hauteur maximale seule importe, l'expression du courant demeure inchangée :

$$I_{\text{EY}}(v) = K_{\text{EY}} e^{-\dot{\varphi}_{\text{max}}} \cdot (e^v - \gamma) \quad [2.61]$$

mais ici, la valeur maximale peut prendre deux valeurs selon que le coin 1 ou le coin 2 du trapèze est limitant :

$$\dot{\varphi}_{\text{max}} = \max \{ \dot{\varphi}_1, \dot{\varphi}_2 \}$$

où les potentiels affectés d'un signe prime sont définis comme auparavant :

$$\dot{\varphi}_{1,2} = \varphi_{1,2} + (1 - n_{1,2}) v$$

L'expression du courant dépend donc de la position des “pics” du trapèze. Le courant dépend de n_1 lorsque le coin 1 est limitant et de n_2 lorsque le coin 2 est le plus élevé. Les tensions appliquées étant de l'ordre de $\Delta\varphi$, il n'est pas rare au cours d'un balayage en tension de passer d'une situation à l'autre. Le haut du trapèze devenant horizontal pour $v = \Delta\varphi_d$ il est facile de voir que les coins 1 et 2 sont limitants pour des tensions respectivement supérieures et inférieures à $\Delta\varphi_d$. Mathématiquement, nous écrirons :

$$\phi_{\max} = \begin{cases} \phi_1 & v > \frac{\Delta\phi}{\Delta n} \\ \phi_2 & v < \frac{\Delta\phi}{\Delta n} \end{cases}$$

La fonction $I(v)$ étant maintenant complètement définie nous passerons comme dans le cas de Nernst-Planck à son étude.

2.3.3.5 Etude analytique de l'expression $I(V)$ selon Eyring

Signalons au départ que l'expression 2.61 est une expression simple et concise pouvant remplacer avantageusement celles confuses ou partielles apparaissant dans la littérature (Hall & coll., 1973; Hall & Latorre, 1976; Latorre & Hall, 1976; Hansen, 1978; Donovan, 1979). L'on peut faire mieux encore, en introduisant un nouveau potentiel tenant compte de la constante K_{EY} . L'équation 2.61 prend alors la forme condensée suivante :

$$I_{EY}(v) = e^{-\phi_{\max}''} (e^v - \gamma) \quad [2.62]$$

avec $\phi_{\max}'' = \max \{ \phi_1'', \phi_2'' \}$

et $\phi_{1,2}'' = \phi_{1,2} + (1 - n_{1,2})v - \ln K_{EY} = \phi_{1,2}^* + (1 - n_{1,2})v$

- ϕ'' : potentiel total englobant la constante K (-)
 ϕ^* : potentiel intrinsèque englobant la constante K (-)

Hormis sa concision, cette forme a l'avantage de montrer le lien naturel existant entre les paramètres ϕ et $\ln K_{EY}$. Ces deux paramètres doivent vraiment être considérés comme des couples dont la différence est constante. Prendre une valeur de K_{EY} dix (10) fois plus élevée équivaut à prendre une hauteur du pic limitant de 59 mV plus faible ($RT/3 = 25,52$ mV à 23°C). Ajouter 100 mV à la valeur standard de ϕ revient au même que postuler une constante K_{EY} cinquante (50) fois plus petite. Nous voyons bien ici que pour une courbe courant-tension donnée, une infinité de couples (ϕ, K_{EY}) sont possibles, mais tous correspondent au même potentiel ϕ^* . Le courant I ne dépend donc, outre v , que de cinq paramètres: $\phi_1^*, \phi_2^*, n_1, n_2$ et γ .

La même remarque peut être faite au sujet de ϕ_1 et $\ln K_{NP}$. Les deux variables sont liées, d'autant plus liées que leur différence est grande par rapport à la tension appliquée. Dans ce cas, l'expression tronquée 2.37 est valide et l'on peut définir alors un nouveau potentiel normalisé ϕ^*_1 rendant automatiquement compte du paramètre K_{NP} . L'approximation de $I(v)$ doit se faire alors en fonction de cinq paramètres seulement.

Avant d'aller plus avant, regardons l'allure de la relation $I(v)$ tel que prédite par la théorie de Eyring. La **figure 2.19** présente la courbe I-V dans le cas du trapèze symétrique. La courbe est symétrique par rapport à l'origine mais montre un léger zig-zag près de l'origine. Dans les mêmes conditions la courbe dérivée selon l'approche de Nernst-Planck ne montre pas de telles bosses (voir figure 2.14). La courbe I-V est encore plus spectaculaire lorsque $\Delta\phi \neq 0$ (trapèze asymétrique). La **figure 2.20** nous montre le tracé I-V d'une barrière dont les coins 1 et 2 se situent respectivement à une hauteur de 300 mV et 240 mV respectivement ($\Delta\phi = -60$ mV). Nous y voyons une nette cassure pour une tension égale à $\Delta\phi_d$ (-100 mV). Ces caractéristiques I-V, a priori inhabituelles, peuvent-elles être expliquées par la théorie ?

2.3.3.5.1 Calcul de la première dérivée de $I(V)$

La première dérivée s'obtient aisément. Elle est donnée par 2.63 :

$$I_{EY}'(v) = K_{EY} e^{-\phi_{max}} \left[n_{max} e^v + (1 - n_{max}) \gamma \right] \quad [2.63]$$

où n_{max} est la position du coin limitant. Le premier terme de la parenthèse crochet étant toujours supérieur au second, la première dérivée est toujours positive. La fonction $I(v)$ est donc une fonction strictement croissante qui ne présente pas d'extrémum. Elle montre toutefois une discontinuité à $v = \Delta\phi_d$. Ce point critique sera noté v_c .

$$v_c = \frac{\Delta\phi}{\Delta n} \quad [2.64]$$

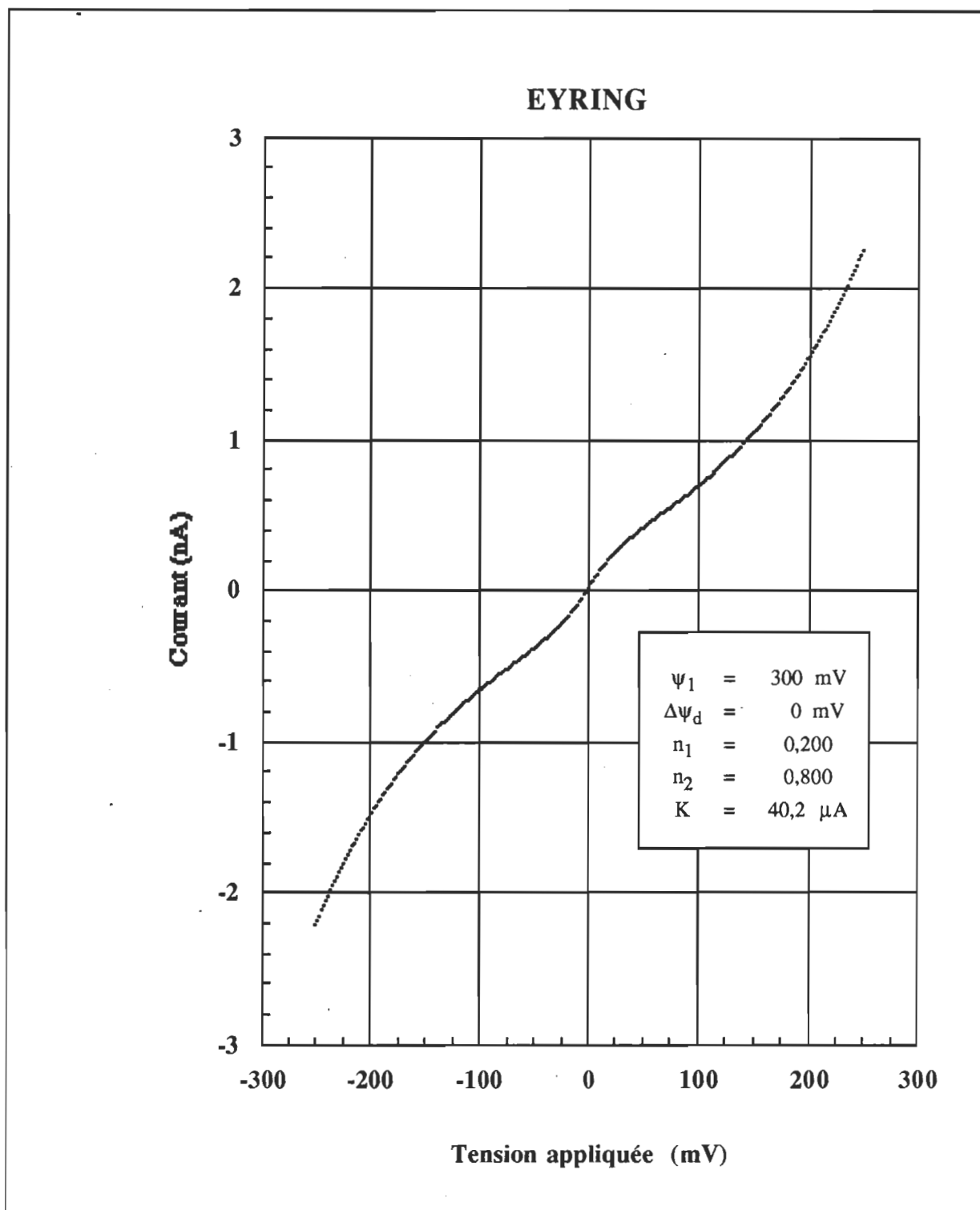


Figure 2.19. – Courbe I-V d'une barrière de potentiel trapézoïdale symétrique prédite par la théorie de Eyring. 250 points furent calculés à partir de l'équation 2.61 et mis en graphique. Les paramètres caractérisant la barrière sont donnés dans l'encadré. À noter les points d'inflexion dans la courbe à -71 mV, 0 mV et + 71mV.

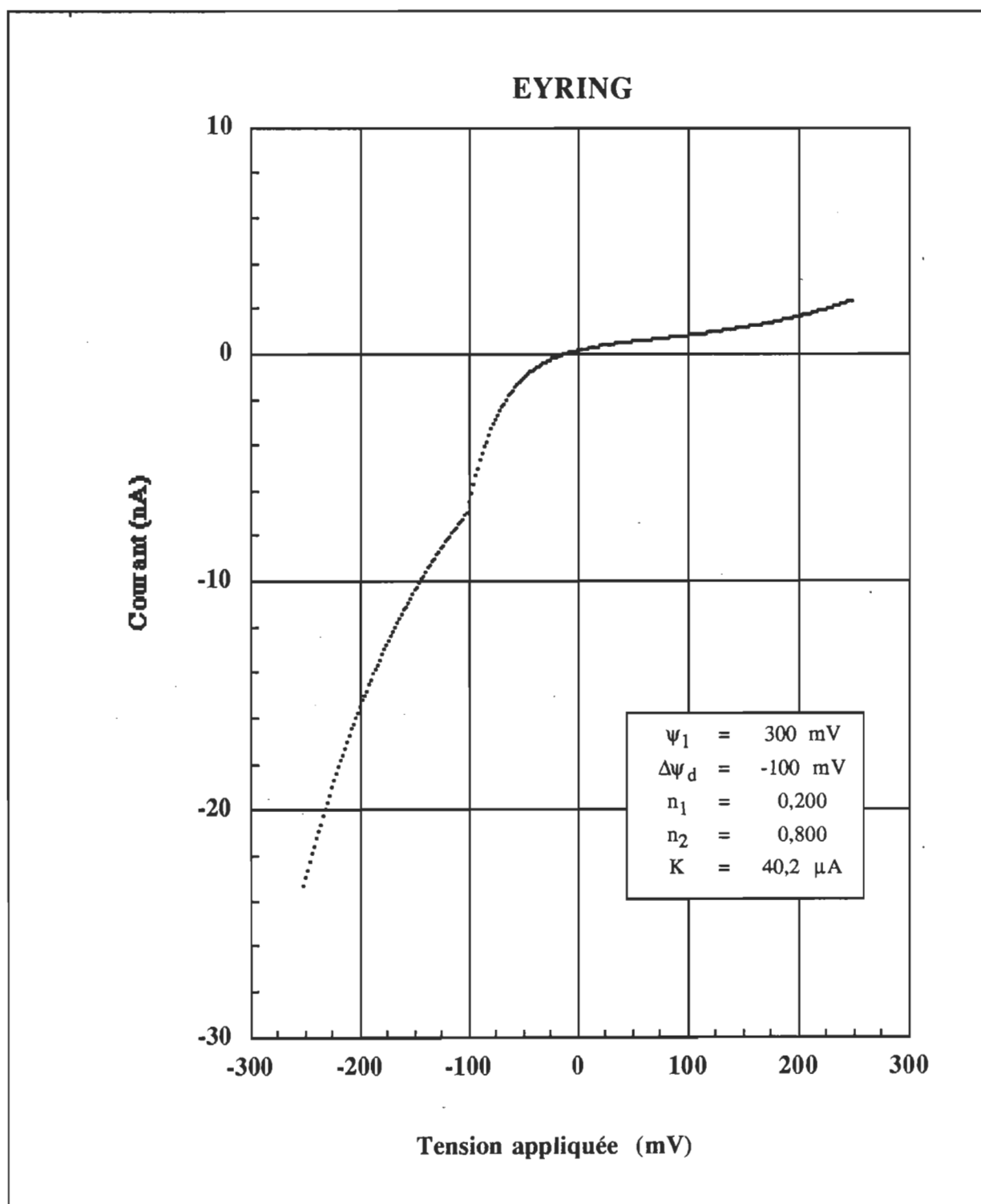


Figure 2.20. – Courbe I-V d'une barrière de potentiel trapézoïdale asymétrique tel que prédit par la théorie de Eyring (équation 2.61). Les paramètres caractérisant la barrière sont donnés dans l'encadré. À noter la discontinuité à -100 mV.

En effet, si l'on s'approche du point critique de la gauche (coin 2 limitant), la dérivée vaut :

$$\lim_{v \rightarrow v_c^-} \dot{I}_{EY}(v) = K_{EY} e^{-\Phi_2} [n_2 e^{v_c} + (1 - n_2) \gamma]$$

alors que si l'on s'approche de la droite (région ou le coin 1 est limitant), elle prend comme valeur :

$$\lim_{v \rightarrow v_c^+} \dot{I}_{EY}(v) = K_{EY} e^{-\Phi_1} [n_1 e^{v_c} + (1 - n_1) \gamma]$$

Le rapport des pentes au point critique est ainsi égal à :

$$\frac{\dot{I}_{EY}(v_{c-})}{\dot{I}_{EY}(v_{c+})} = \frac{n_2 e^{v_c} + (1 - n_2) \gamma}{n_1 e^{v_c} + (1 - n_1) \gamma} \quad [2.65]$$

Et pour des $\Delta\phi$ importants :

$$\frac{\dot{I}_{EY}(v_{c-})}{\dot{I}_{EY}(v_{c+})} \underset{|v_c| \gg \ln \gamma}{\sim} \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^{\text{sgn } \Delta\phi} \quad [2.66]$$

Prenons le dernier exemple et portons l'équation 2.63 en graphique (**figure 2.21**). La première dérivée est toujours positive et montre bien une discontinuité à $v = \Delta\phi_d$. Le rapport des pentes est d'environ 0,25, valeur en accord avec l'équation 2.66. Nous y voyons aussi un minimum autour de 70 mV. Calculons la dérivée seconde et tentons de voir à quoi correspond ce minimum.

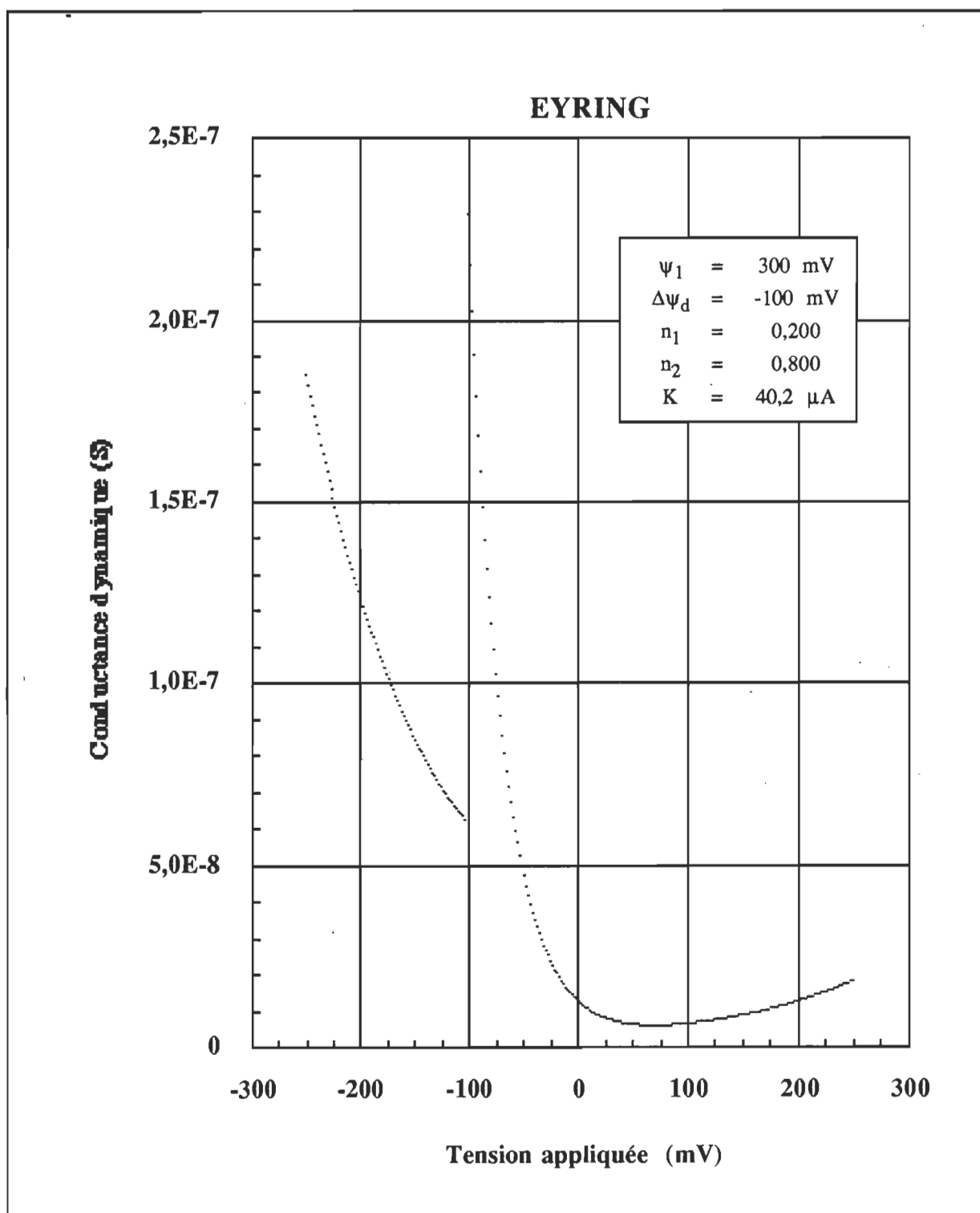


Figure 2.21. – Graphique de la conductance dynamique en fonction de la tension V pour une barrière asymétrique (approche de Eyring). Les points, au nombre de 250, furent calculés à partir de l'équation 2.63. Les paramètres de la barrière apparaissent dans l'encadré, placé en haut de la figure.

2.3.3.5.2 Calcul de la seconde dérivée de $I(V)$

La seconde dérivée s'obtient aussi facilement que la première. Elle est donnée par 2.67 :

$$I_{EY}''(v) = K_{EY} e^{-\phi_{\max}} \left[n_{\max}^2 e^v - (1 - n_{\max})^2 \gamma \right] \quad [2.67]$$

Au point critique, nous avons encore bien entendu une discontinuité, comme en témoigne la **figure 2.22**. Le rapport des dérivées secondes à v_c varie cette fois comme le carré du rapport des n .

$$\frac{I_{EY}''(v_{c-})}{I_{EY}''(v_{c+})} \underset{|v_c| \gg |\ln \gamma|}{\sim} \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^{2 \operatorname{sgn} \Delta \phi} \quad [2.68]$$

Pour un rapport de 4, le changement de pente de la conductance dynamique est de 16 ou de 1/16 selon le signe de $\Delta \phi$.

Cherchons maintenant les zéros de l'équation 2.67. La seconde dérivée s'annule lorsque le premier terme à l'intérieur de la parenthèse crochet est égal au deuxième. La position n_{\max} pouvant prendre deux valeurs, la seconde dérivée peut s'annuler pour deux valeurs de v . Nous noterons ces valeurs de tension v_{i1} et v_{i2} car elles marquent les points d'inflexion de la courbe I - V . L'équation 2.69 nous donne la valeur des v_i :

$$v_{i1,2} = 2 \ln \left(\frac{1 - n_{1,2}}{n_{1,2}} \right) + \ln \gamma \quad [2.69]$$

Fait intéressant: la position des points d'inflexion ne dépend pas de la hauteur du trapèze, elle ne dépend que de la valeur de n et de γ . Leur existence dépend néanmoins de la valeur de $\Delta \phi$. En effet, si $v_{i1} < v_c$ nous n'avons pas de point d'inflexion car à cet endroit ϕ_1 n'est pas ϕ_{\max} . Un même raisonnement nous amène à la conclusion qu'il n'existe pas de point d'inflexion à v_{i2} si celui-ci est supérieur à v_c . Exprimé autrement, il y aura un seul point d'inflexion à v_{i1} si $v_{i2} > v_c$, un seul point d'inflexion à v_{i2} si $v_{i1} < v_c$ et deux points d'inflexion à v_{i1} et v_{i2} si v_c est compris entre les deux valeurs de v_i . En fait, nous avons dans ce cas trois points d'inflexion car v_c lui-même est un point d'inflexion. D'ailleurs, s'il en était autrement, nous aurions une courbe convexe (dérivée seconde négative) lorsque v

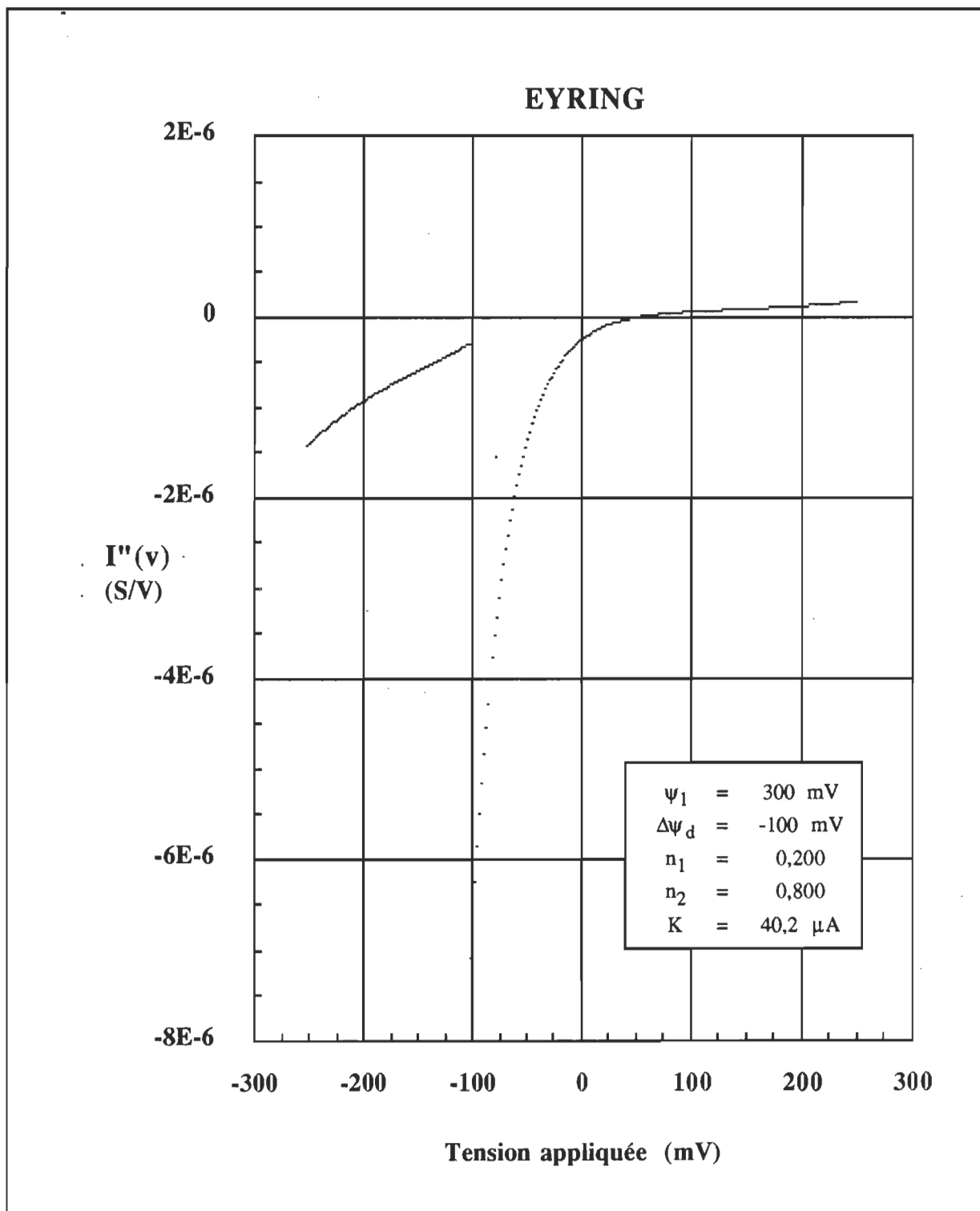


Figure 2.22. – Courbe de seconde dérivée de la fonction $I(V)$ d'une barrière de potentiel trapézoïdale asymétrique tel que prédit par la théorie de Eyring (équation 2.67).

tend vers $-\infty$ et également convexe lorsque v tend vers $+\infty$. Ceci est incompatible avec la forme de l'équation 2.67.

Prenons comme dans les exemples graphiques $n_1 = 0,20$, $n_2 = 0,80$ et $\gamma = 1$. Nous aurons ainsi un seul point d'inflexion à $+71$ mV si $\Delta\phi_d < -71$ mV, un seul à -71 mV si $\Delta\phi_d > +71$ mV, et trois points d'inflexion à $+71$ mV, -71 mV et $\Delta\phi_d$ si $|\Delta\phi_d| < 71$ mV. Dans le cas du trapèze parfaitement symétrique (figure 2.19), c'est la troisième éventualité qui prévaut et nous notons bien qu'il existe trois points d'inflexion: un à l'origine et les deux autres situés à égale distance de l'origine. Pour l'exemple du trapèze asymétrique, c'est la première situation qui se présente ($\Delta\phi_d < -71$ mV) et nous notons bien un point d'inflexion à $+71$ mV. Nous trouvons confirmation à la figure 2.22.

En résumé, la courbe I-V, telle que prédite par la théorie de Eyring, montre une discontinuité au point critique $\Delta\phi_d$ et un ou trois points d'inflexion dépendamment de la valeur de $\Delta\phi$.

2.3.3.5.3 Etude de l'asymétrie de la courbe I-V

De l'expression du courant déduite plus haut, il est facile de calculer le rapport de rectification. Directement de 2.61, nous avons :

$$R_{EY}(v) = \frac{e^{-\phi'_{\max}(v)}}{e^{-\phi'_{\max}(-v)}} \cdot \left(\frac{\gamma - e^v}{e^{-v} - \gamma} \right) \quad [2.70]$$

Mais ici encore le fait d'avoir un profil trapézoïdal où chaque coin est susceptible de jouer un rôle complique un peu la situation. La quantité ϕ'_{\max} apparaissant au dénominateur est-elle la même que celle se trouvant au numérateur ? Il faut examiner cas par cas. Nous avons quatre possibilités: coin 1-coin 1, coin 2-coin 2, coin 1-coin 2 et coin 2-coin 1. Les conditions où ces différents cas se produisent peuvent être déterminées en résolvant, pour chaque cas, un système de deux inégalités. Ainsi le cas 1 (coin 1 limitant pour $v=v$ et $v=-v$) se produit lorsque $|v| > -\Delta\phi_d$, le cas 2 lorsque $|v| < \Delta\phi_d$, le cas 3 lorsque $v > |\Delta\phi_d|$ et enfin le cas 4 lorsque $v < -|\Delta\phi_d|$. Si nous calculons pour chacun des cas le rapport de rectification et que nous prenons le logarithme de chaque membre, nous arrivons, pour $|v| \gg |\ln \gamma|$, à l'équation 2.71 :

$$\ln R_{\text{EY}}(v) \underset{|v| \gg |\ln \gamma|}{\sim} \begin{cases} -\Delta\phi + (n_1 + n_2 - 1) v & v < -\frac{|\Delta\phi|}{\Delta n} \\ (2 n_{1,2} - 1) v & |v| < \frac{|\Delta\phi|}{\Delta n} \\ \Delta\phi + (n_1 + n_2 - 1) v & v > +\frac{|\Delta\phi|}{\Delta n} \end{cases} \quad [2.71]$$

où les cas 1 et 2 sont réunis sur la ligne centrale. Trois faits à noter: i) $\ln R$ montre une dépendance linéaire selon v et $\Delta\phi$, ii) pour des grands v (en valeur absolue) et pour $n_1 + n_2 = 1$, le rapport de rectification n'est plus fonction de v et iii) pour des tensions (en valeur absolue) plus petites que la valeur absolue de $\Delta\phi_d$, le rapport de rectification ne dépend pas de $\Delta\phi$. La **figure 2.23** nous montre trois comportements possibles de la fonction $\ln R(v)$: la pente après le point critique est soit nulle ($n_1 + n_2 = 1$), soit positive ($n_1 + n_2 > 1$), soit encore négative ($n_1 + n_2 < 1$). Nous disposons donc ici d'un test simple nous permettant de déterminer si la position des coins du trapèze est symétrique (pente nulle) ou si le trapèze est déporté vers la droite (pente positive) ou vers la gauche (pente négative). Le graphique de $\ln R$ nous permet aussi de déterminer facilement $\Delta\phi_d$, la différence de potentiel rapportée sur toute l'épaisseur de la région de translocation. Ce $\Delta\phi_d$ peut être visualisé tout aussi facilement sur les courbes de première et seconde dérivée. Quant aux valeurs de n_1 et n_2 , elles peuvent être tirées de la mesure des points d'inflexion (courbe de seconde dérivée) ou de la pente de $\ln R(v)$. En fait, la seule variable que nous ne pouvons extraire "visuellement" demeure ϕ^* .

Résumé

La théorie de Eyring se révèle plus facile d'approche que celle de Nernst-Planck. Les différentes courbes dérivées de la fonction $I(v)$ permettent de déterminer rapidement les paramètres caractérisant la barrière de potentiel trapézoïdale. Seule ombre au tableau: les courbes I - V expérimentales ressemblent-elles à celles prédites par la théorie de Eyring? La nature préfère-t-elle les courbes discontinues et les segments de droite de l'approche de Eyring aux courbes continues et monotones de celle de Nernst-Planck?

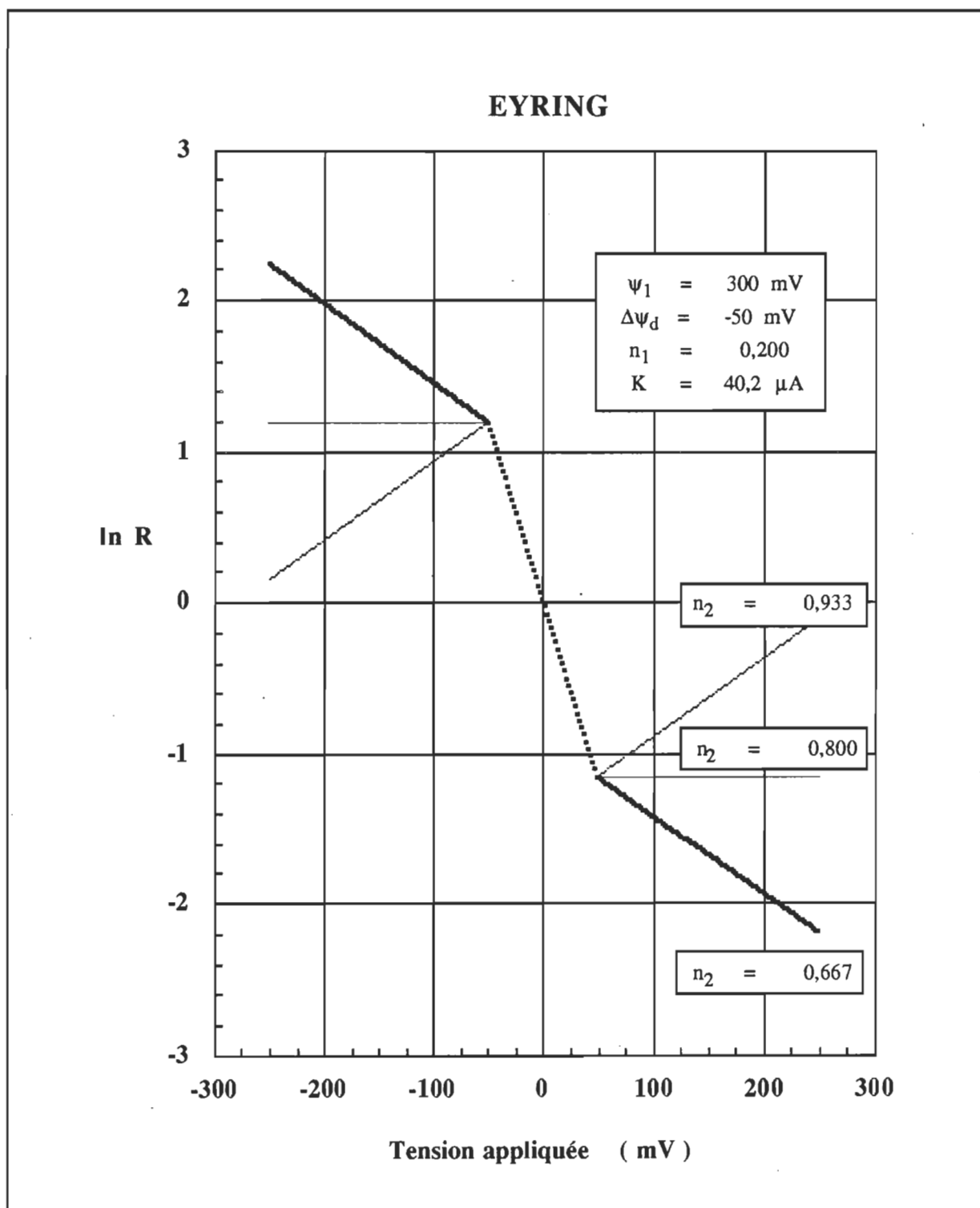


Figure 2.23. – Graphique du rapport de rectification R en fonction de V (approche de Eyring) pour trois barrières trapézoïdales asymétriques. Pour $n_2 = 0,800$ ($n_1 + n_2 = 1$), R ne varie plus avec la tension pour des tensions $|V| > |\Delta\psi_d|$. Pour $n_2 = 0,933$ ($n_1 + n_2 > 1$), la courbe forme un angle aigu à $V = \pm \Delta\psi_d$ alors que pour $n_2 = 0,667$ ($n_1 + n_2 < 1$), elle forme au même point un angle obtus.

2.3.4 Comparaison des approches de Nernst-Planck et de Eyring

2.3.4.1 Rapport des courants

Les deux théories semblent conceptuellement irréconciliables mais il n'en demeure pas moins que les deux formulations de $I(v)$ pour une barrière trapézoïdale sont formellement similaires (équation 2.72) :

$$I_{NP,EY}(v) = \frac{K_{NP,EY}(e^v - \gamma)}{D_{NP,EY}(v, \varphi_1, \varphi_2, n_1, n_2)} \quad [2.72]$$

avec :

$$K_{NP} = \frac{D}{d} \dots \quad K_{EY} = \frac{\tau k T d}{h} \dots$$

Tentons d'abord de relier les constantes K . Pour ce, nous exprimerons le coefficient de diffusion D en fonction des quantités d , τ , k , T , et h . La dérivation de l'équation de Eyring reposant sur l'évaluation d'une vitesse *moyenne* des molécules de complexe activés (Glasstone & coll., 1941, p.128), nous utiliserons une expression où apparaît une distance moyenne (par opposition à une distance *quadratique* moyenne). De la description d'une marche aléatoire unidimensionnelle, nous tirons (Sten-Knudsen, 1978) :

$$\langle x \rangle = \sqrt{\frac{4}{\pi} Dt} \quad [2.73]$$

- $\langle x \rangle$: distance moyenne parcourue par la particule diffusante (m)
- D : coefficient de diffusion de la particule dans le milieu (m²•s⁻¹)
- t : temps requis à la particule pour parcourir la distance $\langle x \rangle$ (s)

Le temps t de l'équation précédente correspond dans la théorie de Eyring à l'inverse de la fréquence de passage des molécules de complexes activés :

$$t = \frac{h}{\tau k T} \quad [2.74]$$

Si nous substituons maintenant l'équation 2.74 dans 2.73 en remplaçant la distance $\langle x \rangle$ par l'épaisseur de la barrière de translocation d , nous obtenons :

$$D = \frac{\pi d^2}{4 t} = \frac{\pi}{4} d^2 \frac{\tau k T}{h} \quad [2.75]$$

et ainsi :

$$\frac{K_{NP}}{K_{EY}} = \frac{\pi}{4} \quad [2.76]$$

Les deux constantes sont pratiquement les mêmes à quelque 25 % près ! Vu l'incertitude reliée aux différents paramètres composant les constantes K_{EY} et K_{NP} , les courbes I-V prédites selon les deux théories ne peuvent donc être discriminées par ce facteur. Examinons maintenant les fonctions $D(v)$. L'expression complète de $D_{NP}(v)$ étant peu maniable, nous n'en conserverons ici que le terme dominant (le terme central provenant de l'intégration entre les deux coins du trapèze) :

$$D_{NP}(v) \underset{\substack{n_1 \rightarrow 0 \\ n_2 \rightarrow 1}}{\sim} e^{\varphi_1 \left(\frac{e^{\Delta\varphi} - 1}{\Delta\varphi} \right)} \quad [2.77]$$

Cette approximation est d'autant plus correcte que le haut du trapèze occupe une grande partie de la distance d (Δn tend vers 1) et que v est petit comparativement à la hauteur de la région centrale du trapèze. Quant à l'expression de $D(v)$ pour Eyring, elle est simplement donnée par :

$$D_{EY}(v) = e^{\varphi_{max}} \quad [2.78]$$

Nous examinerons deux situations limites : $\Delta\varphi' = 0$ et $|\Delta\varphi'| \gg 1$. Dans le premier cas, les fonctions D se confondent et le rapport des courants prédits par les deux théories est donné par celui de leurs constantes :

$$I_{NP}(v) = \frac{\pi}{4} I_{EY}(v) \quad [2.79]$$

Dans le second cas, on trouve :

$$D_{NP}(v) \approx \frac{D_{EY}(v)}{|\Delta\varphi'|}$$

et donc :

$$I_{NP}(v) \underset{|\Delta\phi'| \gg 1}{\sim} \frac{\pi}{4} |\Delta\phi'| \cdot I_{EY}(v) \quad [2.80]$$

Sauf dans le cas particulier où nous avons un trapèze “redressé” ($v = \Delta\phi_d$) et très large et “relevé” ($n_1 \approx 0$ et $n_2 \approx 1$), l’équation de Nernst-Planck prédit des courants plus grands que celle de Eyring. Nous pouvons constater ce fait en jetant au coup d’œil aux courbes I-V présentées antérieurement (figures 2.14, 2.15, 2.19 et 2.20).

2.3.4.2 L'approche de Eyring vue comme cas particulier de celle de Nernst-Planck

Nous venons de voir au paragraphe précédent que l’expression du courant selon Nernst-Planck pouvait se réduire à celle de Eyring sous certaines conditions bien particulières. Ces conditions sont autres pour une barrière rectangulaire (Cooper & coll., 1985). Mais dans les deux cas, nous ne pouvons déduire la forme de l’équation de Nernst-Planck de celle de Eyring. D’un point de vue strictement informationnel, l’approche de Nernst-Planck se révèle supérieure à celle de Eyring. L’une contient les informations concernant tout le trapèze alors que l’autre n’y voit que deux pics. Ce que l’une gagne en complexité, l’autre la perd en simplicité. Nous choisirons donc pour cette raison fondamentale l’approche continue de Nernst-Planck.

Cela ne signifie pas pour autant que l’approche de Eyring ne puisse être utile en d’autres circonstances mais en ce qui concerne l’approximation trapézoïdale la formulation de Eyring est inadéquate. Un trapèze occupe un espace, un volume alors qu’une barrière réactionnelle à la Eyring est très limitée dans l’espace. La théorie de Eyring serait certes mieux appliquée si nous remplacions notre barrière trapézoïdale par une somme de barrières d’environ 1 Å de largeur et dont la hauteur suivrait le contour d’un trapèze. En développant les équations nous retrouverions sans doute une expression $I(v)$ similaire à celle de Nernst-Planck, avec la complexité en plus toutefois...

2.3.5 Prédiction numérique de l'expression de Nernst-Planck

Nous comptons approximer nos courbes I-V expérimentales à l'aide de l'équation 2.35 et, de cette approximation, tirer la valeur des paramètres caractérisant la barrière. La question qui se pose maintenant est de savoir si la courbe I-V est suffisamment sensible à ces paramètres pour que nous puissions les déterminer avec précision.

Nous verrons au chapitre V que les courbes I-V expérimentales sont très semblables, autant au niveau de la forme que de l'amplitude, aux courbes apparaissant aux figures 2.14 et 2.15. Si nous prenons les paramètres ayant généré lesdites courbes et que nous les faisons varier chacun tour à tour, nous aurons une bonne idée de la précision à laquelle nous serions en droit de nous attendre. Avec un critère d'écart de 10% à 250 mV, nous pouvons distinguer des variations des paramètres ϕ^* , $\Delta\phi$, Δn , et γ de l'ordre de 5 mV pour les deux premiers de 0,05 et de 10% pour les deux autres. Compte tenu de la difficulté d'obtenir cette barrière de potentiel ces résultats sont excessivement prometteurs.

Résumé du chapitre II

Dans la première partie du chapitre, nous avons tenté de reconstruire la barrière de potentiel que rencontre une particule chargée traversant une membrane type. Dans ce but, nous avons discuté des contributions connues à ce potentiel total. Pour les contributions des potentiels de Gouy, dipolaire et de distribution, nous avons généralisé les formulations existantes afin de tenir compte de la nature asymétrique des membranes à l'étude. La compréhension de la barrière d'énergie totale s'en est trouvée accrue mais le profil intramembranaire du potentiel total est demeurée très approximatif. À défaut d'une expression précise caractérisant la forme de la barrière d'énergie, nous avons opté, à l'instar d'autres chercheurs, pour l'approximation trapézoïdale.

Dans la seconde partie nous avons établi une relation entre le courant, la tension appliquée et les paramètres de la barrière trapézoïdale; et ce, pour les théories de Eyring et de Nernst-Planck. Dans les deux cas, des expressions originales furent développées. Bien que ces expressions conduisent à des prédictions radicalement différentes, nous avons démontré

qu'elles étaient formellement similaires. En rapprochant les deux expressions, il est toutefois apparu que l'expression développée pour la théorie de Eyring constituait un cas particulier de l'expression de Nernst-Planck, plus générale. Naturellement, nous avons convenu de modéliser la translocation voltage-dépendant de la nonactine au-travers d'une barrière asymétrique de potentiel selon ce dernier modèle.

CHAPITRE III

MATÉRIEL, MONTAGES ET MÉTHODOLOGIES

3.1 Description du montage expérimental

La recherche expérimentale et la recherche théorique s'entretiennent, s'entr'organisent, s'entr'appellent l'une l'autre. Du concept on passe à l'expérience et celle-ci nous ramène au concept. Tout ceci n'est possible que grâce à "l'interface technique". L'évolution même de cette interface est un signe de l'évolution de la recherche. La technique est moyen, puis aboutissement. On assiste alors à un changement de "génération" et tout recommence. Différents montages ont été expérimentés tout au long de cette étude. Nous ne discuterons ni de chacun ni des multiples raffinements dont ils ont bénéficié, sinon que pour supporter certains propos.

L'appareillage relié à la fabrication de bicouches Montal-Mueller n'a pas vraiment changé depuis l'arrivée de la technique (la première description à peu près complète du montage se retrouve dans l'article de Montal, 1974). L'on y retrouve toujours les mêmes éléments: bain de téflon (polytétrafluoroéthylène), système anti-vibrations, seringues en polypropylène, cage de Faraday, circuits de mesures électroniques. Une seule innovation digne de mention: l'emploi de cuves de Langmuir destinées à contrôler la pression de surface des films lipidiques à partir desquels la bicouche est formée (Tancrède & coll., 1983). Pour différentes raisons, cette innovation n'a pas réussi à s'implanter comme nouveau standard. À vrai dire, ce sont les appareils de mesure électroniques et toute l'interface informatique

régissant la prise et le traitement des données qui ont surtout évolué. Les dernières revues consacrées aux montages de bicouches planes (Alvarez & coll., 1985; Alvarez, 1986; Schindler, 1989) en font largement état.

Le montage utilisé au laboratoire durant les dernières années est représenté schématiquement à la **figure 3.1**. La partie gauche rassemble les parties mécaniques et optiques du montage alors que l'on retrouve à droite l'appareillage électronique et informatique. Certains appareils que l'on pourrait qualifier d'accessoires ou de périphériques (stéréomicroscope, table traçante, etc.) ne sont pas représentés afin de ne pas trop alourdir la figure. Les éléments les plus importants du montage (bain de bicouches, électrodes, circuits électroniques, interface informatique) feront l'objet des prochaines sections.

3.1.1 Bain de préparation de bicouches

Les bains de bicouches initialement conçus au laboratoire (Tancrède & coll., 1983; Robert & coll., 1985) consistaient en deux bassins de Langmuir accolés l'un à l'autre et pouvant communiquer via une ouverture pratiquée sur la paroi conjointe des deux bassins. Ces bains ne convenaient pas à la présente étude pour deux raisons majeures: premièrement, la grande surface des bains amène un fort bruit parasite limitant sensiblement la mesure de faibles courants; deuxièmement, ces bains ne permettaient pas d'agiter les phases aqueuses. En plus de requérir de grandes quantités de matériel, ces bains de grandes dimensions ne permettaient pas non plus de changer les concentrations salines des phases aqueuses par simple ajout d'aliqots de solutions concentrées.

Après quelques essais, le bain de bicouches apparaissant à la **figure 3.2** fut réalisé. Nous y retrouvons deux bassins en téflon (Johnston Industrial Plastics, Lachine, Qc), notés *cis* et *trans*, entre lesquels s'insère un élément appelé porte-membrane. La particularité de ce bain réside en la présence de parois fixes divisant la surface de chacun des bassins en deux parties. La partie de droite, d'une surface de 25 cm², est réservée à l'étalement du film alors que la partie gauche sert d'aire de travail où l'on insère électrodes, tubes capillaires et seringues. La présence de ces parois permet donc à l'expérimentateur de travailler, à sa guise, sans toucher le film déposé dans la section adjacente. Cela est d'une grande utilité comme nous le verrons plus loin. Ces parois sont surélevées de quelques 6 mm au-dessus

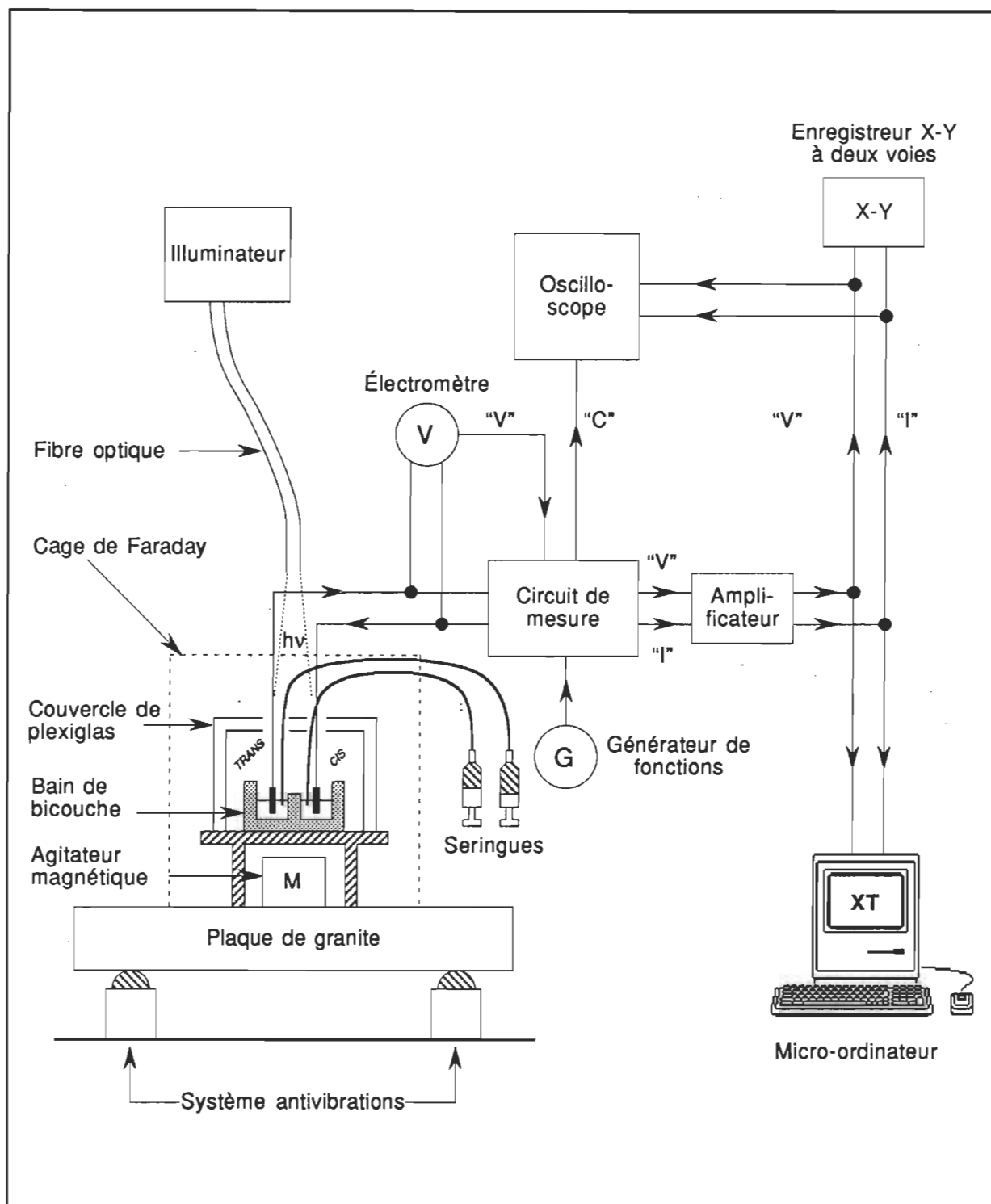


Figure 3.1. – Schéma global du montage utilisé pour fabriquer des bicouches Montal-Mueller. (Stéréomicroscope, table traçante et autres appareils périphériques ne sont pas représentés).

du fond des bassins afin de permettre l'équilibration de la phase aqueuse entre les deux parties de chacun des bassins.

Chaque bassin contient un puits d'agitation de 17 mm de diamètre et de 6 mm de profondeur. L'emplacement de ce puits a causé certains soucis car nous désirions une agitation permettant d'homogénéiser rapidement tous les recoins du bassin. La position qui nous apparaissait la plus adéquate se retrouve sur la figure 3.2.

Examinons maintenant la partie centrale du bain de bicouche, là où justement la bicouche est fabriquée. Nous y retrouvons une enclave, moitié en cis, moitié en trans, devant accueillir le porte-membrane et le support hydrophobe. Le porte-membrane, illustré à la **figure 3.3**, est constitué de deux disques identiques en téflon, d'environ 5 mm d'épaisseur. Chacun possède une fenêtre circulaire située à la même hauteur sur le disque. Entre ces disques, nous introduisons un mince film de téflon (le support) percé, au préalable, d'un petit orifice au travers duquel la bicouche se forme ²⁹.

Trois points critiques doivent être surveillés lors de la réalisation des bassins et du porte-membrane. Premièrement, afin de garantir une parfaite étanchéité entre les bain cis et trans, la correspondance entre les dimensions de l'enclave et du porte-membrane doit être la plus parfaite possible (la tolérance mécanique ne peut dépasser 30 μm). Deuxièmement, et pour la même raison, les côtés contigus de chacun des bassins doivent être aplanis afin de permettre un accolement parfait. Signalons que le téflon se déforme facilement suite à une pression mécanique ou à un changement de température. Troisièmement, le design du porte-membrane doit permettre une apposition aisée des films lipidiques le long du support hydrophobe. Si le diamètre intérieur de la fenêtre du porte-membrane est trop petit, les films lipidiques ne peuvent mouiller pleinement la partie exposée du support de téflon et la bicouche ne peut être formée. Il nous est apparu que le diamètre de l'ouverture devait être supérieur à l'épaisseur du disque. Afin de favoriser encore plus le mouillage des films lors de la montée des niveaux d'eau, nous avons évasé le pourtour de la fenêtre. Un angle de 75° par rapport à l'axe de l'orifice semble suffisant.

²⁹ L'appellation «porte-support» serait plus appropriée mais puisque le support «supporte» la membrane modèle et que le raccourci fut consacré par l'usage, nous garderons le terme «porte-membrane».

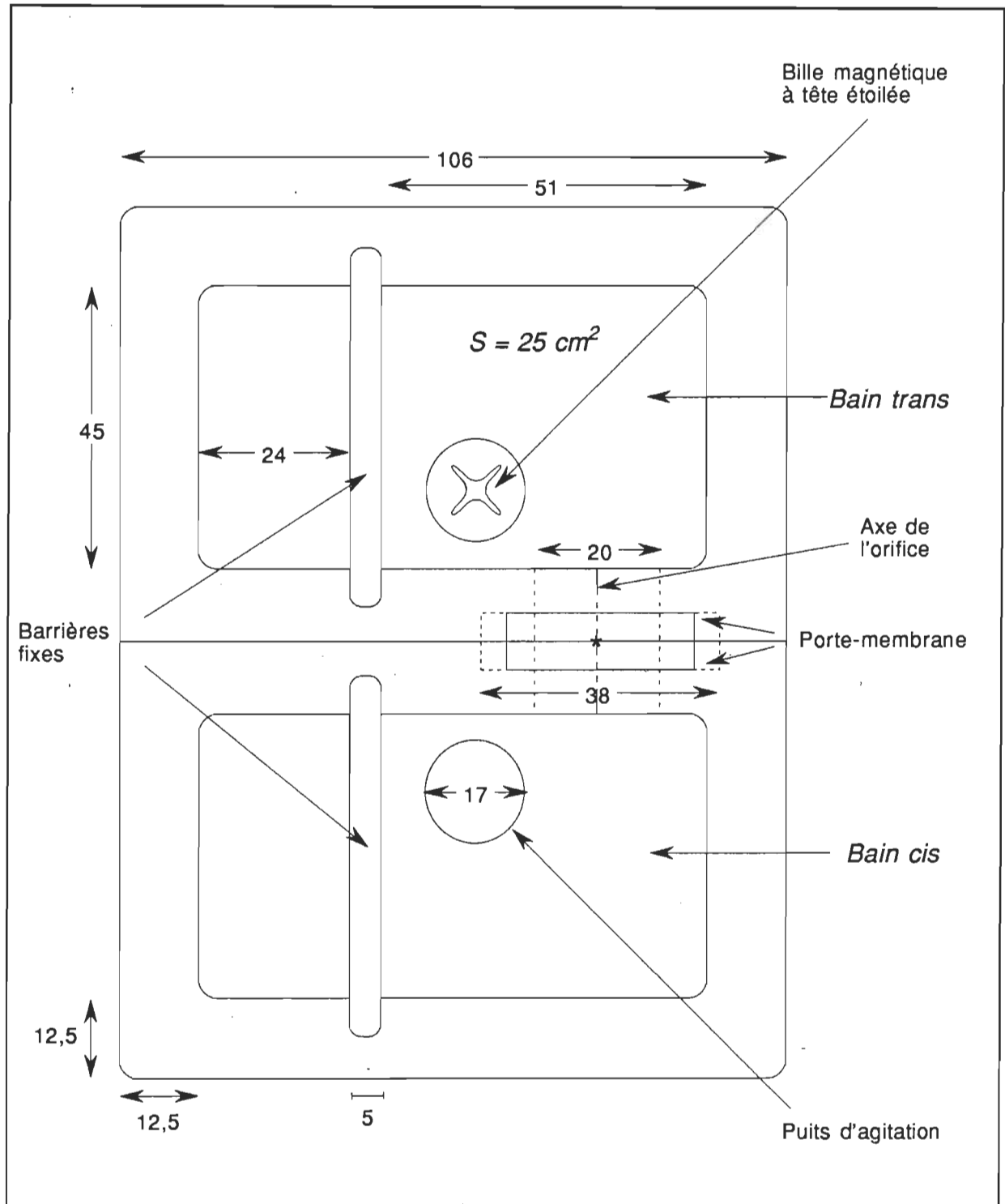


Figure 3.2. – Dessin, à l'échelle, du bain de bicouche (vue de haut). Toutes les mesures sont données en millimètres. L'épaisseur du fond des bassins cis et trans est de 13 et 11 mm, respectivement. La bicouche se forme à l'endroit marqué d'une étoile.

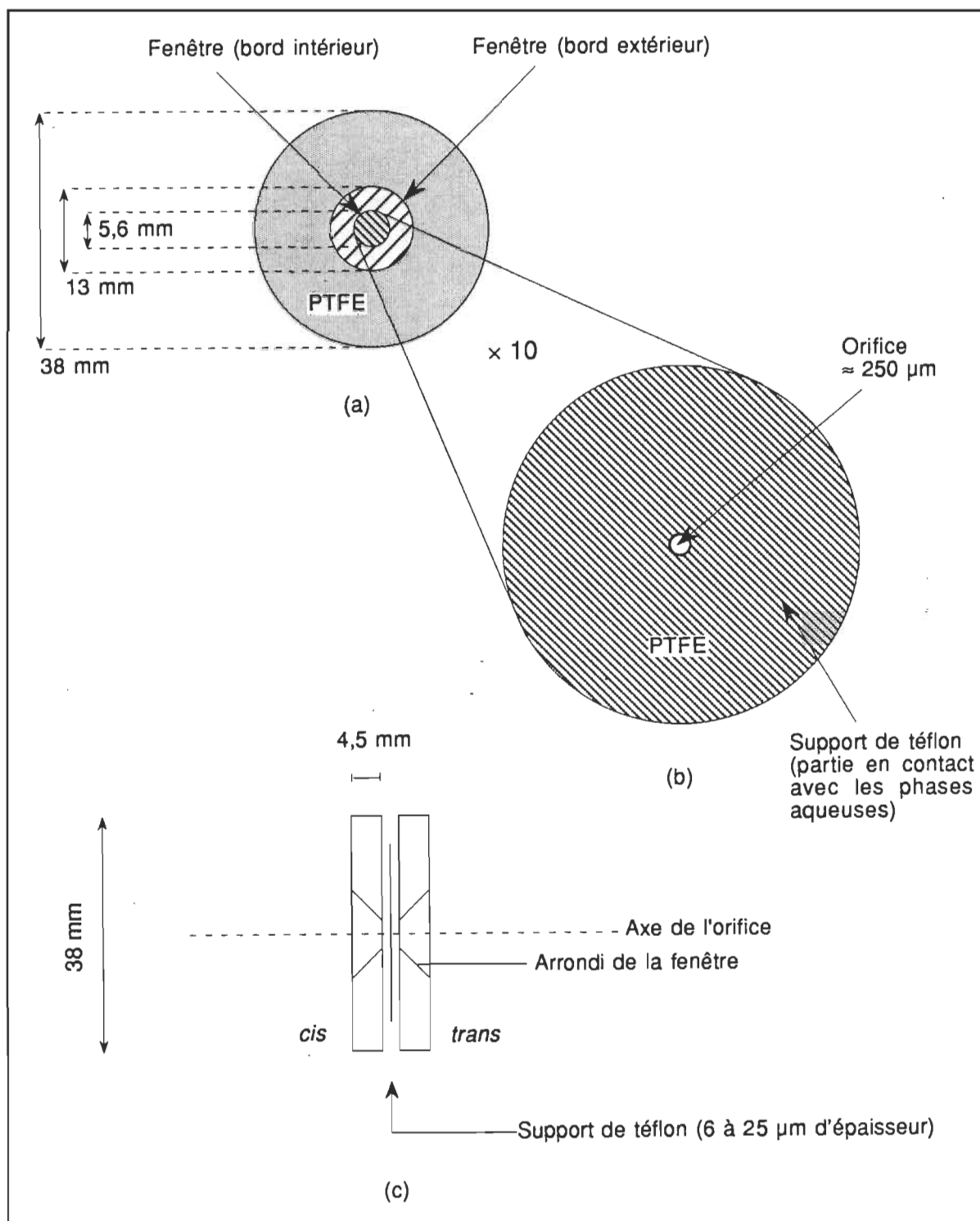


Figure 3.3.— Schéma du porte-membrane et du support hydrophobe: (a) vue de face; (b) agrandissement de la fenêtre (vue de face); (c) vue de profil. (Dessins à l'échelle).

La **figure 3.4** nous donne un aperçu du bain de bicouches. On y voit les deux bassins côte à côte, les électrodes, la base et le couvercle de plexiglas (polyméthylméthacrylate). La base de plexiglas permet d'aligner et de maintenir les bassins dans une position bien définie. Elle est supportée par quatre pattes, d'environ 10 cm de hauteur. Cette hauteur permet de dégager un espace suffisant pour placer un agitateur magnétique (Fisher Scientific Co., modèle 120MR, Montréal, Qc) sous le bain de bicouches. Un couvercle de plexiglas protège le bain des poussières et des mouvements de convection d'air. Cinq ouvertures sont pratiquées au travers du couvercle: deux pour les électrodes, deux pour les tubes capillaires par lesquels nous ajustons les volumes d'eau (voir figure 3.1) et une pour permettre l'arrivée d'azote. Le couvercle permet, en outre, de maintenir plus aisément une atmosphère d'azote au-dessus des films lipidiques, prévenant ainsi la peroxydation des lipides.

Tout le montage est isolé électriquement par une cage de Faraday fabriquée à partir de papier aluminium ou encore de fil grillagé. L'ensemble est supporté par une plaque en granit de 61 x 89 x 10 cm (Paquin & Fils, Trois-Rivières, Qc) reposant sur un système antivibrations à air comprimé (Technical Manufacturing Corp., modèle Micro-g, Woburn, MA) atténuant d'un facteur 10 et plus toute vibration mécanique de fréquence supérieure à 7 Hz. Les bicouches Montal-Mueller sont très fragiles et sans ce système antivibrations, il est difficile voire impossible de les former.

3.1.2 Circuits électroniques

Le montage électronique se divise en deux blocs: l'un permet de mesurer la capacité à une fréquence et à une tension données; l'autre de mesurer simultanément, et sur une large gamme, courant et tension. Nous étudierons les deux circuits en deux temps. Dans le premier, nous en ferons une description sommaire en expliquant le principe; dans le second (section 3.2.5), nous nous attarderons à la mesure, telle qu'effectuée lors d'une expérience avec une bicouche, formules et calculs à l'appui.

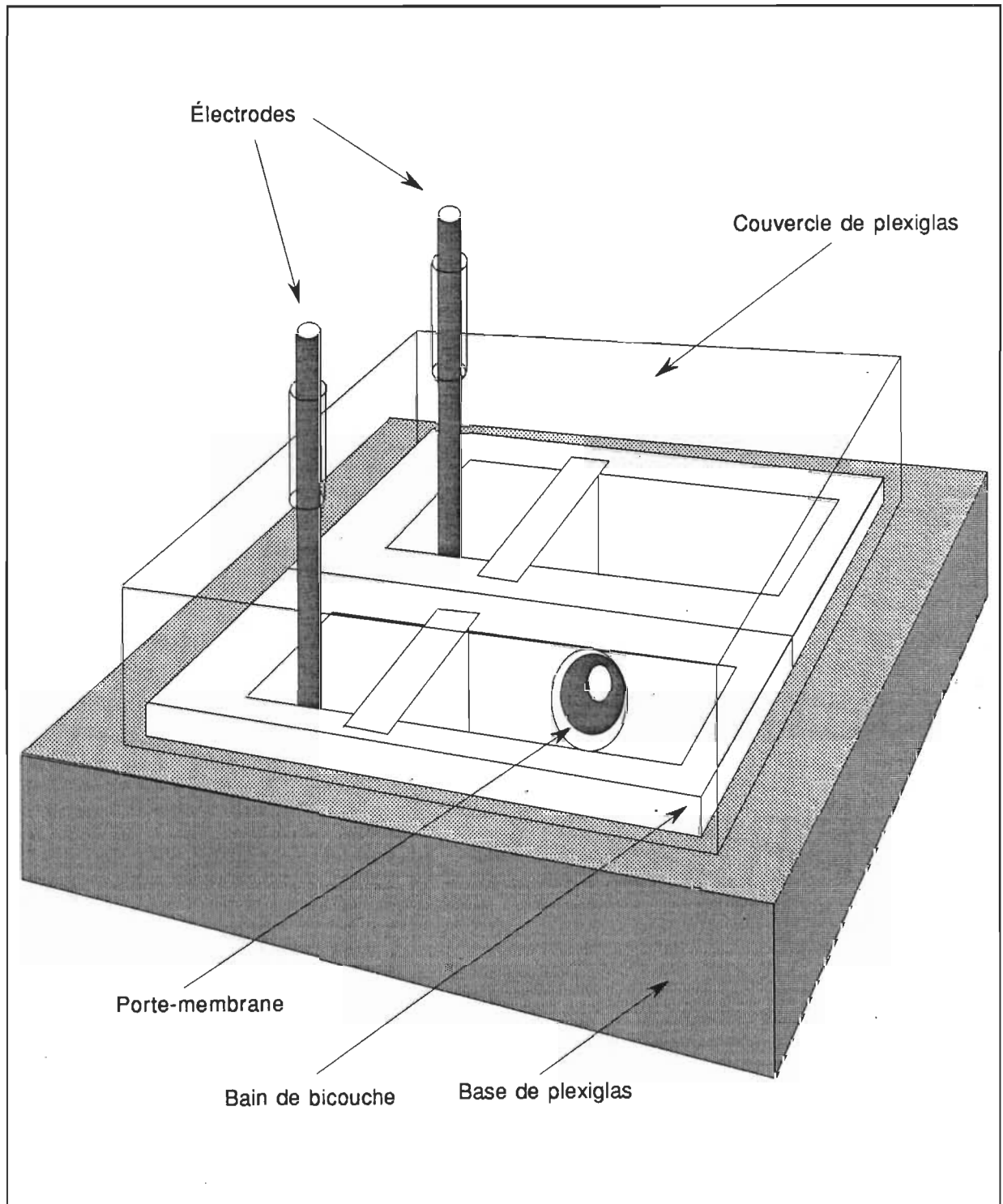


Figure 3.4. – Vue en perspective du bain de bicouches. (Inspiré de Robert & Tancrède, 1991).

3.1.2.1 Circuit de mesure de la capacité membranaire

Trois méthodes peuvent être utilisées pour mesurer la capacité de la bicouche. La plus utilisée, anciennement, consiste à appliquer un saut de tension à une bicouche en série avec une résistance connue et à mesurer le courant traversant cette dernière. On peut alors déterminer la capacité, soit en calculant à partir de l'aire sous la courbe, la charge transférée (Montal, 1974), soit en mesurant la constante de temps (Andreoli, 1974). La deuxième méthode, plus précise, consiste à mesurer la capacité à l'aide d'un pont d'impédance à courant alternatif, commercial (Pickar & Amos, 1976) ou non (White & Blessum, 1975). Aujourd'hui, la méthode la plus courante consiste à appliquer à la bicouche une onde de tension triangulaire (amplitude entre 10 à 100 mV, fréquence entre 1 et 1000 Hz) et à mesurer le courant à l'aide d'un convertisseur courant-tension. L'amplitude de la tension à la sortie (signal rectangulaire) est directement proportionnelle à la capacité membranaire. Cette méthode se révèle populaire car elle s'effectue avec le même circuit servant à la mesure de la conductance membranaire. Elle n'est cependant pas aussi précise que celle utilisant un pont d'impédance.

Nous avons opté au laboratoire pour la méthode du pont d'impédance. Le pont que nous avons conçu s'inspire de celui d'Alvarez & Latorre (1978). Il est composé de deux branches: celle du haut (voir **figure 3.5**) contient une résistance variable R_y et un condensateur C_y de valeur connue; celle du bas, la capacité que nous voulons mesurer C_x et une résistance standard de valeur connue R_s . Une onde sinusoïdale, d'environ 50 mV d'amplitude et de fréquence égale à 1000 Hz, est appliquée à chacune des branches via un générateur de fonctions programmable (Hewlett-Packard, modèle HP 8116A, Böblingen, Allemagne). Le courant dans chacune des deux branches est converti en tension grâce à un amplificateur opérationnel monté selon la configuration de convertisseur courant-tension. Les deux convertisseurs courant-tension sur chacune des deux branches sont identiques (voir circuit détaillé à l'**annexe 1**). Un amplificateur d'instrumentation différentiel, composé de trois amplificateurs opérationnels, soustrait et amplifie les ondes provenant de chacune des deux branches. C'est lui, en fait, qui détecte les légers déséquilibres du pont de capacité. Nous retrouvons finalement à la sortie de l'ampli différentiel une série de filtres passe-haut et passe-bas rejetant tout signal parasite de fréquence plus élevée ou plus faible que celle du signal d'entrée. Le signal est visualisé sur un oscilloscope digital à mémoire (Nicolet Instruments, modèle 4094, Madison, WI).

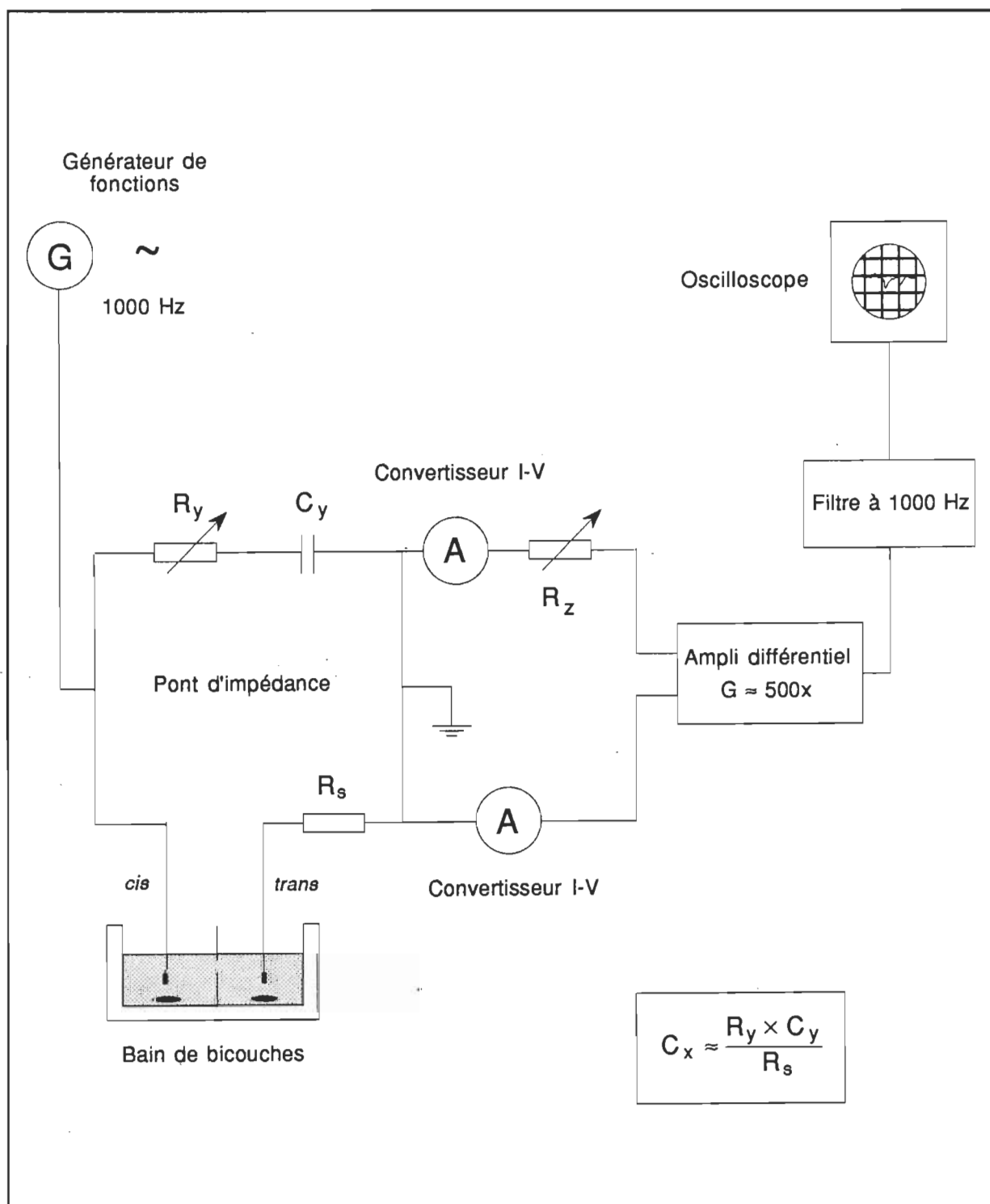


Figure 3.5.— Schéma-bloc du circuit de mesure de la capacité membranaire. (Le circuit électronique complet apparaît à l'annexe 1).

Le zéro du pont s'effectue à l'aide de deux résistances variables, R_y et R_z . L'ajustement de la première permet de rendre la phase de l'onde, circulant dans la branche du haut, égale à celle circulant dans la branche du bas. L'ajustement de la seconde, située à l'entrée de l'ampli différentiel, sert à égaliser l'amplitude des deux ondes circulant dans chacune des branches. La méthode consiste donc à rendre nul le signal sinusoïdal apparaissant à l'oscilloscope à l'aide de R_y et R_z . Nous verrons plus loin que c'est à partir de la mesure de R_y après équilibrage du pont que nous pouvons déterminer la capacité C_x .

Quelques points d'intérêt concernant la réalisation du montage. Il faut d'abord s'assurer d'une source de tension "propre". Un filtre passe-bas à la sortie de la source suffit en général pour épurer le signal sinusoïdal des fluctuations de l'alimentation à 60 Hz. Le deuxième point concerne la sensibilité du pont. Celle-ci dépend principalement i) de la qualité des amplificateurs opérationnels de l'ampli d'instrumentation (ceux-ci ont avantage à posséder un gain en tension à boucle ouverte élevé), ii) du niveau de bruit ramené à son entrée et iii) du gain total de la configuration. À ce sujet, il faut éviter de mettre des gains trop importants sur l'amplificateur différentiel. Au premier étage, des gains de plus de 100 n'augmentent plus, vu le niveau de bruit provenant de l'interface air-eau, la sensibilité du pont. Le rapport signal sur bruit plafonne avec le gain (capacité parasite). Au second étage, il est préférable de ne pas dépasser un gain de 30 car un signal haute fréquence apparaît alors à l'entrée de l'amplificateur OP-27E (phénomènes d'oscillation de l'amplificateur). Dernier point: prendre soin de choisir un condensateur de qualité dans la branche de compensation. Nous recommandons un condensateur de précision de polystyrène ou de polycarbonate ayant une grande stabilité à long terme. Celui que nous avons utilisé est un condensateur de polystyrène (Rifa Electronics, modèle PFE 210, Stockholm, Suède) de 988 pF de capacité.

3.1.2.2 Circuit de mesure de la conductance membranaire

La mesure de conductance membranaire, qu'elle soit statique ou dynamique, implique la mesure de la tension appliquée à la membrane et du courant en résultant. La bicouche lipidique étant constituée d'un milieu intérieur isolant, sa résistance est par conséquent très élevée et puisqu'elle ne supporte que des tensions inférieures à 300 mV environ, les courants mesurés sont extrêmement faibles, de l'ordre du pA. Deux choix s'offrent à nous:

utiliser un picoampèremètre ou encore monter un amplificateur opérationnel sous la configuration convertisseur courant-tension ³⁰.

La configuration convertisseur courant-tension permet, comme son nom l'indique, de "traduire" un courant, même très faible, en une tension, plus facile à "manipuler". Dans cette configuration (voir Girard, 1989, figure 7.51 ou voir amplificateurs CA3140 apparaissant à l'annexe 1), la borne non inverseuse (marquée d'un signe plus) est mise à la terre alors que la borne inverseuse (signe moins) est branchée à la source de courant. Une résistance est placée en contre-réaction entre la borne inverseuse et la sortie de l'amplificateur opérationnel. La tension différentielle d'un ampli opérationnel étant très près de zéro (dans le cas idéal, elle est exactement nulle), la borne inverseuse se trouve à un potentiel zéro (masse virtuelle). L'amplificateur idéal ne détournant aucun courant, la résistance de contre-réaction, R_f , est traversée par le courant que l'on veut mesurer. Il apparaît donc à la sortie de l'amplificateur une tension V_o , donnée par $-R_f \cdot I$. Le courant est donc égal, au signe près, à la tension de sortie divisée par la valeur de R_f , connue.

La mesure de faibles courants requiert l'utilisation d'un amplificateur opérationnel à très faible courant de polarisation (technologie «FET») affectant peu le courant à mesurer (se rapprochant donc le plus possible de l'amplificateur opérationnel idéal). L'amplificateur opérationnel utilisé, le modèle AD42K (Analog Devices, Norwood, MA) possède un courant de polarisation d'au maximum 100 fA avec une impédance d'entrée de 10 TΩ. Acheté, il y a plusieurs années, l'AD42K s'est fait damer le pion par des amplificateurs plus performants encore (technologies « JFET », « MOSFET »). Les amplis AD310K, de la même compagnie, le 3430J de la compagnie Burr-Brown et le ICH8500A de la compagnie Intersil, possèdent tous des caractéristiques (courant de polarisation maximal, impédance d'entrée) dix fois meilleures que le AD42K. Leur prix tourne autour de 500 dollars mais ces amplis valent bien le déboursé, compte tenu des prix courants des picoampèremètres.

Le circuit complet de mesure courant-tension apparaît à l'**annexe 2**. Le convertisseur I-V se trouve en haut de la figure, au centre. Un choix parmi quatre résistances de contre-réaction est possible afin de mesurer sur une large gamme les courants membranaires (n'oublions

³⁰ Soulignons que le coeur des picoampèremètres (appareils mesurant des courants de l'ordre du pA) fabriqués aujourd'hui est justement constitué d'un amplificateur opérationnel sous la configuration convertisseur I-V.

pas que les bicouches dopées à la nonactine montrent une conductance de plusieurs ordres de grandeur plus élevées que les bicouches lipidiques pures). Tel qu'indiqué dans l'encart, ces résistances vont de 1 à 100 000 M Ω . Les deux échelles les plus "élevées" (servant à la mesure des faibles courants) sont obtenues à l'aide d'une configuration dite en T. Cette configuration nous permet d'avoir des résistances de contre-réaction allant jusqu'à 1000 G Ω , ce qui ne serait pas possible directement avec une seule résistance. À 100 G Ω déjà, les meilleures résistances sur le marché montrent d'importantes variations de leur résistance selon la température, le degré d'humidité, ou encore la tension appliquée à leurs bornes. Avec ces quatre échelles, nous avons accès à des mesures du courant allant de 20 fA à 10 μ A, sans aucune amplification supplémentaire.

Ces performances ne seraient pas possibles sans l'ajout de condensateurs mis en parallèle avec les résistances de contre-réaction. Les condensateurs et les résistances de contre-réaction font office de filtres passe-bas atténuant les bruits parasites. Le choix des condensateurs n'est pas évident car, comme le mentionnent Alvarez & coll. (1985), un amplificateur peut se mettre à osciller selon la capacité du condensateur relié à la borne inverseuse. Un amplificateur peut être stable dans une situation donnée, puis instable dans une autre. Le fait d'avoir quatre échelles entraîne, on s'en doute, quelques complications... Nous avons dû procéder à de multiples essais - ayant lieu dans des conditions "d'expérimentation" - pour finalement réussir à obtenir la stabilité désirée. Il fut établi aussi qu'il fallait privilégier une échelle dont la résistance de contre-réaction est de dix fois inférieure à la résistance à mesurer.

Comme indiqué sur le schéma complet, nous avons installé sur notre boîte de contrôle un interrupteur permettant de mesurer le courant, soit à l'aide de l'amplificateur AD42K, soit à l'aide d'un électromètre digital programmable (Keithley Instruments Inc., modèle 617, Cleveland, OH) utilisé sous le mode picoampèremètre. Selon les spécifications de l'appareil, le courant de polarisation maximal serait de 5 fA et l'impédance d'entrée supérieure à 200 T Ω . Nous comparerons ultérieurement les performances de nos deux "picoampèremètres".

Passons maintenant à la mesure de la tension. Celle-ci peut s'effectuer de nouveau avec l'électromètre, utilisé alors sous le mode voltmètre (**figure 3.6**). La haute impédance d'entrée permet de mesurer précisément la différence de tension existant de part et d'autre

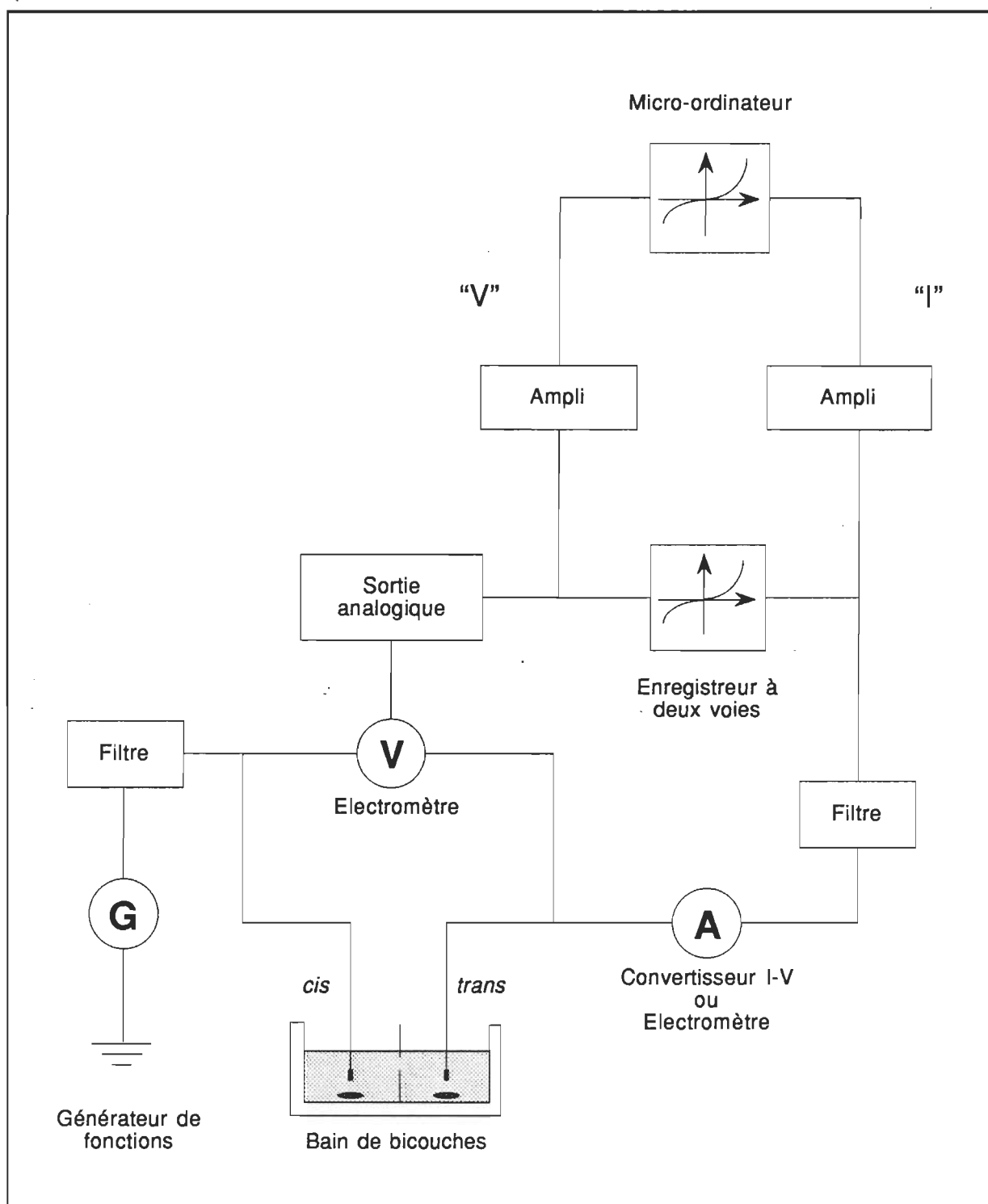


Figure 3.6. – Schéma-bloc du circuit de mesure courant-tension. (Le circuit électronique complet apparaît à l'annexe 2).

de la bicouche. Nous pouvons aussi brancher un simple multimètre à affichage digital (Keithley, modèle 179A, Cleveland, OH) à la borne de l'électrode "*cis*". La tension mesurée correspond à celle mesurée à l'électromètre indiquant bien qu'il n'existe aucune chute de potentiel entre l'électrode *trans* et la masse du circuit. Nous avons par la suite mesuré la tension V , indistinctement, d'une manière ou de l'autre.

Examinons maintenant l'ensemble du circuit de mesure courant-tension (annexe 2). Nous voyons à gauche le bloc générateur dont l'élément principal est le générateur de fonctions programmable (Hewlett-Packard, modèle HP 8116A, Böblingen, Allemagne). Il peut générer des ondes triangulaires (utiles pour les courbes I - V), sinusoïdales, rectangulaires et même des impulsions très brèves si la situation l'exige. Nous pouvons aussi nous en servir comme source de tension continue si nous désirons mesurer la conductance à une tension fixe. Cet appareil, d'une grande versatilité, reçoit une mention de choix dans la dernière édition du livre d'Horowitz & Hill (1989). Nous avons toutefois dû installer un filtre actif d'ordre 3 à sa sortie afin d'obtenir un signal de basse fréquence de qualité supérieure. Un calcul simple nous montre que pour une capacité à l'entrée de 320 pF (valeur proche de celle d'une bicouche), un bruit de 500 μ V d'amplitude et de fréquence égale à 1 Hz suffit à générer un courant de 1 pA, de l'ordre des courants à mesurer, donc. Nous avons dû également ajouter un filtre à la sortie de l'ampèremètre afin d'obtenir un signal ayant un bon rapport signal/bruit.

Les deux mesures, de tension et de courant, arrivent ensuite à un amplificateur à deux canaux (la tension est acheminée via le canal 0 et le courant via le canal 1). Chacun des signaux peut être amplifié selon trois gains différents (voir annexe 2) puis filtré de nouveau avant de parvenir à la carte d'acquisition de données. La tension et le courant peuvent être mesurés simultanément à l'ordinateur, sur un enregistreur X-Y à deux voies (Philips, modèle PM8134, Eindhoven, Hollande) ou encore à l'oscilloscope (Nicolet Instruments, modèle 4094, Madison, WI). L'enregistreur et l'oscilloscope peuvent être branchés à l'entrée ou à la sortie des amplificateurs, selon le désir de l'expérimentateur.

3.1.3 Acquisition des données à l'ordinateur

L'utilisation d'amplificateurs avec gains et filtres s'est révélée nécessaire à cause de l'éloignement entre la boîte de contrôle et la carte d'acquisition de données (bruits

parasites, perte de signal, etc.) mais aussi à cause des spécifications de la carte d'acquisition. La carte d'acquisition choisie (Data Translation Inc., modèle DT2801A, Marlborough, MA) est une carte 12 bits à quatre gains programmables. La précision de la carte est donc d'environ 0,025% de la valeur pleine échelle mais pour de petites valeurs de courant ou de tension, le bit le moins significatif peut amener de sérieuses erreurs et rendre une courbe lisse (en lecture analogique) en une courbe dite en escalier.

Nous avons pu circonvenir à cet inconvénient, d'une part, en utilisant à l'aide des différents gains (amplificateurs et carte d'acquisition) la pleine échelle de la carte mais surtout en profitant des capacités d'acquisition de ladite carte. Afin d'obtenir une meilleure précision sur la lecture, nous avons envoyé un signal de tension constante et nous avons procédé à une acquisition de 1000 points à 200 Hz (la fréquence de l'horloge permet des fréquences d'acquisition entre 15 et 13 000 Hz) et calculé la tension moyenne. Nous avons ensuite ajusté le gain de la carte de manière à faire concorder les deux tensions. En répétant l'exercice sur toute l'échelle, et pour les quatre gains, nous avons considérablement gagné en précision (0,01% à pleine échelle, de l'ordre de 0,5% au centième de la pleine échelle).

La carte d'acquisition est présente dans une fente d'expansion d'un micro-ordinateur type XT (Philips, modèle P3102, Eindhoven, Hollande), lequel gère l'acquisition et le traitement des données. À cet effet, différents programmes en langage Fortran ou Basic ont été réalisés au laboratoire. Un premier dénommé AQIV commande l'acquisition de données des courbes I-V. En mode interactif, nous fournissons la fréquence de balayage de l'onde triangulaire, son amplitude, le facteur d'amplification sur chacun des canaux, le nombre de cycles I-V et le nombre total de points acquisitionnés. Le programme calcule la fréquence d'acquisition et celle-ci démarre lorsque l'expérimentateur appuie sur une touche. L'acquisition terminée, les tensions digitalisées sont reconverties en volts, puis moyennées selon les directives de l'utilisateur du programme.

Un deuxième programme, IDEV, transforme, à l'aide des gains entrés précédemment en interactif, les tensions moyennées en couples tension-courant (exprimés en mV et en A respectivement). Un troisième programme, TRACN, est ensuite appelé. Celui-ci utilise les fichiers de sortie du programme IDEV et transforme les couples I,V en données exécutables à la table traçante (Philips, modèle PM8154S, Eindhoven, Hollande). Un quatrième programme, TPZIV, manipule également les fichiers de sortie du programme IDEV en vue

d'en extraire les paramètres de la barrière trapézoïdale. La section 3.2.6 sera consacrée à cette étape "d'extraction" de la barrière de potentiel.

3.1.4 Électrodes

Les électrodes constituent une part essentielle du montage. Elles font la jonction entre les milieux métalliques conducteurs et les solutions électrolytiques. D'une conduction électronique, l'on passe à la surface des électrodes à une conduction ionique. Idéalement cette transition se passe sans anicroche mais il arrive parfois que des potentiels de jonction soient présents et, lorsque l'électrode est traversée par un courant, que des tensions de polarisation s'y développent. Nous devons faire attention à ce que ces phénomènes n'affectent pas nos mesures.

Dans le passé, nous employions au laboratoire des électrodes Ag/AgCl provenant de différentes compagnies (Fisher Scientific Co., Sargent-Welch Co., Ingold Electrodes). Malheureusement, leur grande résistance (entre 10 et 30 k Ω) rendait leur emploi difficile. En effet, la résistance des électrodes n'étant pas négligeable devant la résistance R_s , nous devions en tenir compte lors de nos mesures de capacité. En mesurant la résistance des électrodes fréquemment, nous nous sommes aperçus que celle-ci variait avec la composition de la solution aqueuse, la température et de manière générale, avec le temps. Qui plus est, la mesure de résistance était parfois inférieure, parfois supérieure à la résistance d'accès (la résistance reliée au passage de l'électrolyte au travers d'une petite surface) ce qui rendait l'étude du comportement des électrodes plus difficile encore. L'idée de fabriquer nos propres électrodes nous est donc venue tout naturellement...

3.1.4.1 Préparation des électrodes Ag/AgCl

3.1.4.1.1 Préparation du fil d'argent

La fabrication d'électrodes Ag/AgCl nécessite l'emploi de fil d'argent de grande pureté. Celui que nous nous sommes procuré provient de la compagnie Aldrich (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI). Sa pureté est supérieure à 99,9%. Le diamètre du fil commandé est égal à 1 mm. Nous découpons d'abord le fil en sections de 165 mm de longueur (la longueur nécessaire à la fabrication d'une électrode). Nous le sablons ensuite à l'aide de

papier sablé très fin (#600). Le fil est ensuite enroulé autour d'une tige rigide de 3 mm de diamètre (6 spires environ). Nous coupons les deux extrémités de manière à ramener la longueur totale du fil à environ 150 mm. Nous donnons ensuite une forme finale à la future électrode (une forme semblable à un rouleau à peinture mais dont le rouleau serait formé de spires hélicoïdales). Les deux extrémités du fil sont ensuite sablées de manière à obtenir deux surfaces planes.

Vient ensuite une deuxième série d'étapes visant à nettoyer et à apprêter le fil d'argent pour la chloruration. On rince d'abord la future électrode à l'eau, à l'acétone, à l'éthanol, puis, de nouveau, à l'eau distillée. On la trempe ensuite deux minutes dans l'ammoniaque pure, sous une hotte, afin d'éliminer toute trace d'oxydes d'argent. On la rince de nouveau à l'eau distillée. On trempe ensuite la future électrode dans de l'eau régale venant tout juste d'être préparée (l'eau doit être d'un jaune franc) pendant environ 45 secondes. Le fil passe alors d'une couleur argent à un gris métallique homogène. L'on rince de nouveau avec les solvants distillés, tel qu'indiqué auparavant. On place finalement la future électrode à l'étuve à 120°C pendant cinq minutes afin de la débarrasser de toute trace d'humidité.

3.1.4.1.2 Chloruration des électrodes

La chloruration du fil d'argent s'effectue en faisant parcourir un courant entre celui-ci et une contre-électrode, tous deux plongés dans une solution contenant des ions chlorure. Une solution de KCl 500 mM donne de bons résultats. Nous immergeons le fil d'électrode sur une distance de 25 mm dans la solution de chloruration, la "tête" vers le bas. Nous installons la cathode, constituée en l'occurrence d'une électrode de platine (Radiometer, modèle P101, Copenhague, Danemark), dans ce même bécher et nous procédons aux branchements. Le fil d'Ag est relié à la borne positive de la source de tension (source de haute tension Heathkit, modèle IP-17, Heath Co., Benton Harbor, MI) et la cathode, via l'ampèremètre (électromètre digital Keithley, modèle 617 Cleveland, Ohio), au régulateur de courant. Ce dernier repose sur l'emploi d'un transistor NPN (TIP 31C) et d'une diode Zéner. En termes techniques, il s'agit d'un régulateur par contrôle de la tension base-émetteur sans compensation thermique. Un diagramme simplifié du montage global apparaît à la **figure 3.7**.

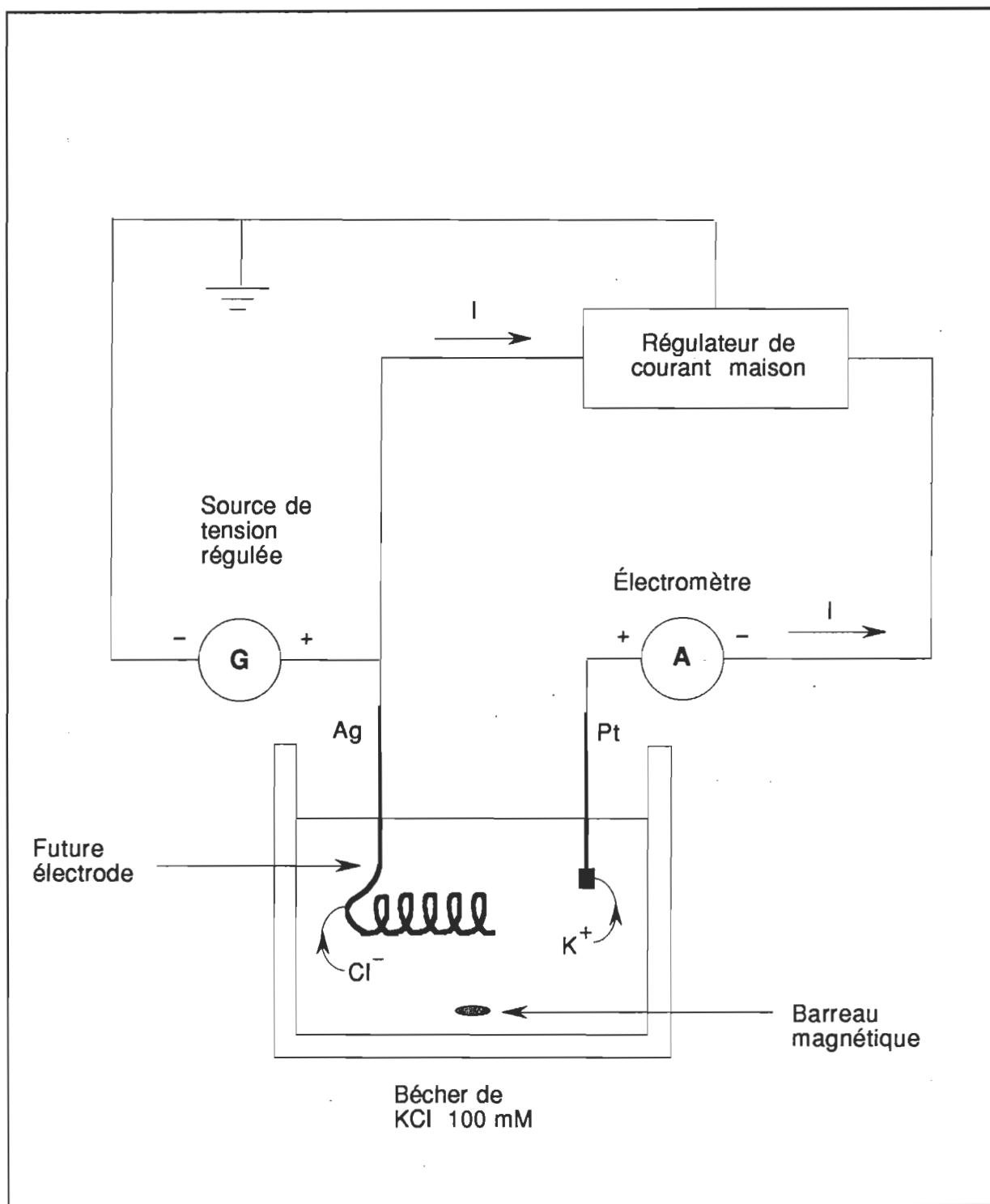


Figure 3.7. – Diagramme simplifié du montage servant à la chloruration des électrodes.

L'emploi d'un régulateur de courant se révèle nécessaire puisque la résistance du fil d'Ag chute considérablement lors de la chloruration. Le régulateur permet d'obtenir, en fournissant un courant constant, une chloruration régulière et, par conséquent, un dépôt homogène. Une résistance variable nous permet, en outre, de choisir le courant de chloruration.

Passons maintenant aux aspects plus quantitatifs. Premièrement, nous calculons, à partir de la profondeur d'immersion, de la longueur totale du fil et de la hauteur de l'électrode la longueur du fil d'Ag qui sera chlorurée. Nous choisissons ensuite "l'ampleur" de la réaction de chloruration, en termes quantifiables, le degré de conversion de l'Ag en AgCl. Ceci établi, nous calculons à l'aide de l'équation 3.1 quelle est la charge qui devra être transférée pour atteindre ce degré de conversion. Selon 3.1, le produit du courant moyen, \bar{I} , par le temps, t , durant lequel ce courant circule est proportionnel au volume du fil immergé et au degré de conversion, %.

$$\bar{I} t = 1229,4 \varnothing^2 L \% \quad [3.1]$$

- \bar{I} : courant moyen pendant la chloruration (mA)
- t : temps de la chloruration (min)
- \varnothing : diamètre du fil d'argent (cm)
- L : longueur de la section du fil immergée dans la solution de chloruration (cm)
- % : degré de conversion de l'argent en chlorure d'argent (%)

Le degré de conversion recommandé se situe entre 1 et 10% mais c'est à 5% que nous avons obtenu les meilleurs résultats. En ce qui a trait à \bar{I} , il peut varier entre 1 et 20 mA. La valeur de courant retenue fut de l'ordre de 7 mA. De cette manière, nous évitions des phénomènes de surchauffe et nous avons un temps de chloruration adéquat. Ainsi si l'on prend, $\varnothing = 0,10$ cm, $L = 10,7$ cm (une surface de chloruration de $3,36 \text{ cm}^2$), $\% = 5,0\%$ et $\bar{I} = 7,0$ mA, nous obtenons à l'aide de 3.1 un temps de chloruration de 94 minutes.

Notons que le diamètre du fil d'argent peut être évalué à mieux qu'un pourcent en pesant l'électrode juste avant l'étape de chloruration. Mais plus intéressant encore, c'est qu'en effectuant de nouveau la pesée après chloruration, nous pouvons calculer le rendement de la réaction. Celui-ci, défini comme le rapport entre le pourcentage de conversion prédéterminé (théorique) et le pourcentage de conversion établi selon la différence des masses (expérimental), peut être calculé d'après l'équation suivante :

$$R = \frac{4535,8 \Delta m}{(\bar{I} t)_{\text{exp}}} \quad [3.2]$$

R : rendement de la réaction de chloruration (%)

Δm : augmentation de la masse du fil d'argent suite à la chloruration (mg)

Le rendement obtenu pour nos six dernières électrodes est de $99,7 \pm 0,8$ %. L'écart-type correspond, grosso modo, à l'incertitude estimée par calcul d'erreurs.

Mettre ce procédé au point a nécessité de nombreuses heures et ce n'est qu'après avoir établi formules et pris mesures que la méthode a pris forme. La plupart des protocoles établis dans la littérature sont très imprécis. Il est souvent question de couleur et selon les auteurs (Janz & Ives, 1968; Ferris, 1974), d'un arc-en-ciel de couleurs ! Il serait plus simple de dire au lecteur qu'après 10 mA•min, le fil d'argent de 0,3 cm³ devient noir, qu'il prend ensuite une couleur brune; qu'autour de 500 mA•min il grisonne et que si nous avons pris soin de tourner le fil pendant le passage du courant, il possède alors une couleur brun-mauve homogène, avec des reflets gris-blanc à la périphérie. Et d'ajouter qu'il importe de chlorurer sous lumière tamisée !

3.1.4.1.3 Vieillessement et conservation des électrodes

Les électrodes sont placées dans une solution de KCl 100 mM pendant 72 heures à l'obscurité. Les électrodes sont court-circuitées entre elles afin d'éviter que ne se développent des tensions d'asymétrie. Les électrodes qui seront utilisées passent ensuite par une période de rodage alors que les autres sont conservées au réfrigérateur dans une solution de KCl 10 mM. Elles peuvent y être conservées plusieurs mois sans que leurs propriétés électriques ne soient affectées.

3.1.4.2 Propriétés électriques des électrodes-maison

Les propriétés électriques de ces électrodes se sont révélées excellentes. Afin de stabiliser les propriétés de la paire d'électrodes choisie, nous les soumettons à une dizaine de cycles d'une onde triangulaire de 250 mV à 3 mHz. Après ce pré-traitement, les courbes I-V (voir **figure 3.8**) montrent un comportement presque ohmique et une légère hystérèse. Fait à

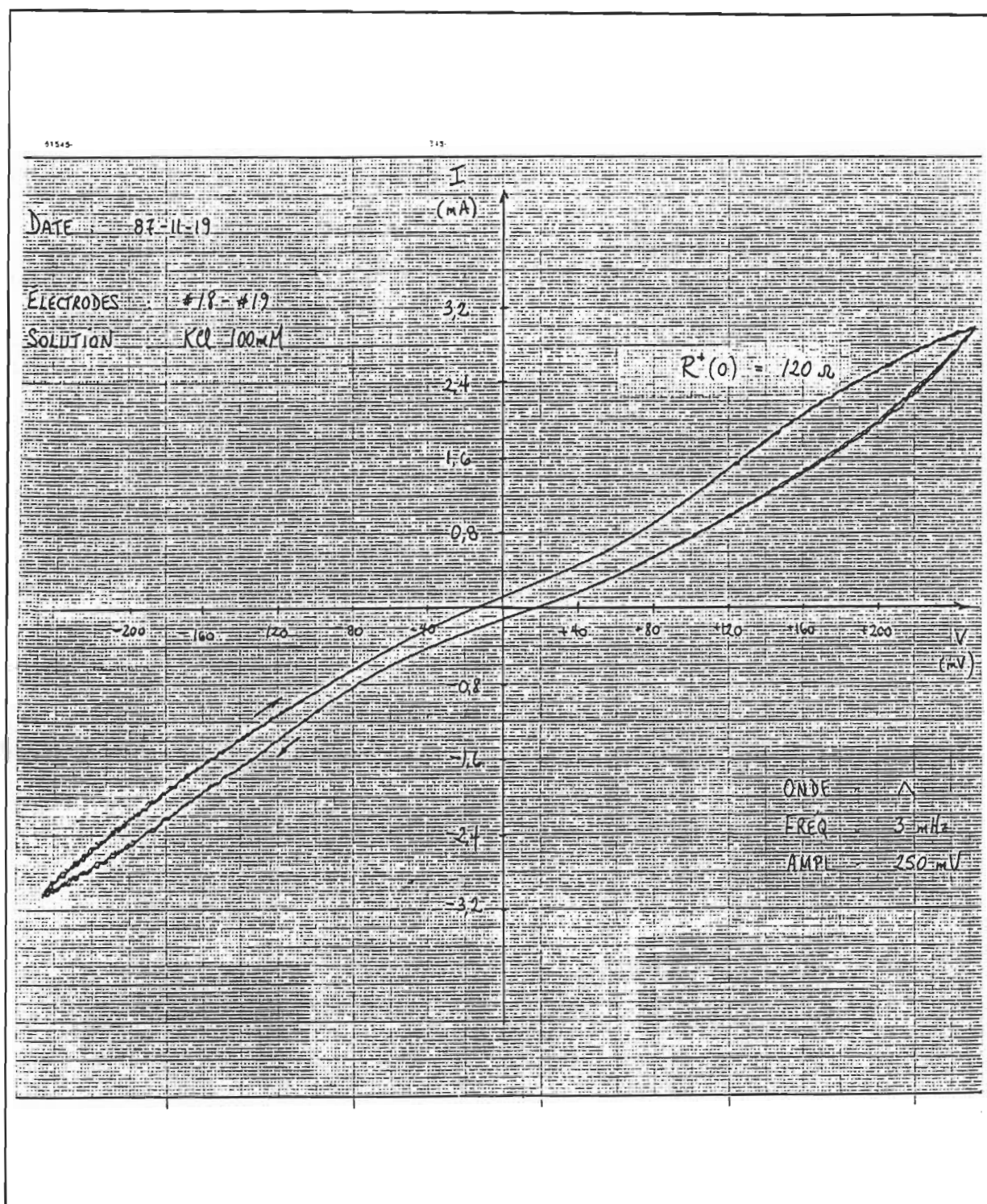


Figure 3.8. – Caractéristiques courant-tension des électrodes maison. Les deux électrodes (#18 et #19) furent chlorurées en parallèle. Courant moyen lors de la chloruration: 10,0 mA. Temps de la chloruration: 131 min. Degré de conversion de l'Ag en AgCl: 4,8%. Surface de chloruration: 3,45 cm². Résistance dynamique près de l'origine: 120 Ω.

noter, elles montrent toutes, peu importe la paire choisie, des formes très similaires et qui ne dépendent pas (ou très peu) du temps (3 cycles I-V sur la figure 3.8, sans changement notable de la résistance). La résistance des électrodes à faible tension se situe entre 50 et 300 Ω et le potentiel d'asymétrie demeure inférieur à 1 mV.

3.2 Méthodologies

3.2.1 Procédés de nettoyage

La technique des films lipidiques plans, tout comme celle des films monomoléculaires, requiert des conditions de grande propreté. Pour l'une la présence de contaminants et de poussières modifie les propriétés à l'étude, pour les autres, elle peut même empêcher la tenue de l'expérience. Tout produit, toute matière pouvant entrer en contact, directement ou indirectement, avec les bicouches Montal-Mueller doit faire l'objet d'un examen minutieux. Les procédures de nettoyage et la pureté des produits doivent être contrôlées.

En ce qui concerne la verrerie, la technique de nettoyage au No-Chromix fut utilisée. Le No-Chromix (Godax Laboratories, New York, NY) est un oxydant inorganique qui, lorsque mélangé avec de l'acide sulfurique, forme une solution de nettoyage extrêmement efficace laissant la surface du verre exempte d'ions et de résidus de détergent ou de nature organique. Après avoir trempé la verrerie pendant une heure dans la solution oxydante, nous la rinçons cinq fois à l'eau filtrée, puis nous la laissons une heure dans une solution de NaOH 100 mM. Nous rinçons de nouveau cinq fois à l'eau filtrée et nous laissons tremper la verrerie une heure à l'eau distillée. Un dernier rinçage à l'eau distillée et nous laissons égoutter.

Nous avons au laboratoire une bonne expertise concernant le nettoyage de la verrerie, mais concernant le nettoyage des pièces en téflon, beaucoup de travail restait à faire. Nous avons donc fait quelques essais de nettoyage sur de petits morceaux de téflon - permettez-nous l'expression - "consciencieusement salis". Les morceaux furent d'abord mis en contact avec les principaux produits utilisés, à savoir les phospholipides PE et PS, la nonactine et l'enduit hydrophobe, le squalène. Quatre procédés de nettoyage furent testés: la solution de NaOH dans l'éthanol chaud et le mélange chloroforme-méthanol 2:1 (v/v), abondamment cités dans la littérature, et les procédés de nettoyage au No-Chromix et à l'acide

sulfochromique (voir paragraphe précédent). Les résultats montrent que le mélange de solvants 2:1 nettoie bien les phospholipides mais ne réussit guère à déloger la nonactine et le squalène. Par contre, la solution de NaOH, à chaud, nettoie chacun des constituants mais dans une bien moindre mesure que le procédé au No-Chromix. Le procédé au No-Chromix démontre cependant quelques faiblesses lorsque le même morceau est sali par tous les constituants. Quant à l'acide sulfochromique, il tache le téflon.

La procédure de nettoyage retenue fut la suivante: après chaque jour d'expérimentation, sonication pendant une période de vingt minutes du bain et des pièces attenantes dans un bain à ultrasons (Mettler Electronics Corp., modèle ME4.6, Anaheim, CA) rempli de chloroforme-méthanol (solvants préalablement distillés); trempage une heure dans l'eau distillée; procédure de nettoyage au No-Chromix tous les vingt jours d'expérimentation environ.

3.2.2 Perforation de l'orifice

Le bain de bicouches étant bien propre et bien sec, nous passons à la préparation du support. Première étape: découper à l'aide d'un scalpel un morceau d'environ 20 mm d'un ruban de téflon (type "C", Fluorocarbon, Dilectrix Division, Lockport, NY) de 25 mm de largeur. Des rubans de 6, 9, 13, 19 et 25 μm d'épaisseur furent utilisés. Deuxième étape: nettoyer le morceau de téflon à l'hexane dans un vase de Petri. Cette opération vise surtout à enlever les charges électrostatiques toujours désagréables lors de la manipulation de la bande de téflon. Troisième étape: placer le morceau de téflon entre les deux parties d'une pièce (analogue au porte-membrane) de forme rectangulaire et centrer la bande dans l'ouverture. La grande ouverture de la fenêtre de cette pièce, et sa forme rectangulaire, permettent de travailler plus à notre guise sur le support de téflon que ne le permettrait le porte-membrane circulaire. Pour des morceaux de téflon de faible épaisseur, nous introduisons sous la bande un morceau de téflon supplémentaire de 50 μm d'épaisseur afin d'assurer une bonne rigidité à l'ensemble.

Nous arrivons à l'étape de la perforation de la bande de téflon. Cette étape est critique et détermine pour une bonne part le taux de réussite lors de la formation de la bicouche. Un orifice dont le rebord est rugueux et irrégulier ne permettra pas la formation de bicouches Montal-Mueller. L'épaisseur du support étant de quelques microns, les artisans de la

technique ont par conséquent dû faire preuve d'ingéniosité. La littérature fait état de deux procédés: l'un, mécanique, utilise une pointe de seringue équerrie (voir Donovan, 1979); l'autre, thermique, utilise un fil de platine chauffé (voir Hansen, 1978). Les deux procédés ont leurs désavantages: la perforation par la pointe de seringue laisse souvent des bavures sur le pourtour de l'orifice tandis que la perforation avec fil de platine chauffé produit des orifices qui ne sont pas circulaires et dont la surface est difficile à déterminer.

Nous avons conçu au laboratoire différents outils mécaniques pour perforer des trous (Tancrede & coll., 1983; Robert & coll., 1985). Le dernier en date tient d'une véritable poinçonneuse (voir **figure 3.9**). Première étape, nous installons la pièce rectangulaire sur le pied de la poinçonneuse, la bande de téflon s'appuyant parfaitement sur la butée inférieure. Seconde étape, nous abaissons le bras mobile jusqu'à ce que la butée supérieure coince la bande de téflon. Troisième étape, nous appuyons d'un geste franc sur le poussoir. Une pointe de mèche de perceuse, préalablement équerrie, émerge alors de la butée supérieure, transperce le film et poursuit sa course dans un canal à peine plus grand qu'elle. Nous remontons alors le bras mobile et retirons la pièce rectangulaire de la butée inférieure. Nous retirons délicatement, si nécessaire, la bande de téflon supplémentaire et nous examinons l'orifice sous l'oeil d'un microscope (Wild-Heerbrugg, modèle M11, Bâle, Suisse).

Les trous obtenus, d'un diamètre de 270 μm , sont d'excellente qualité. Les bavures n'excèdent pas 4 microns et l'ellipsité ne dépasse pas 1,02. Des trous de cette qualité étaient difficiles à obtenir avec les autres instruments. Nous devons donc faire de multiples essais avant de parvenir à percer un orifice acceptable. L'outil apparaissant à la figure 3.9 n'a qu'un seul défaut - un défaut de taille - celui de ne percer que des trous d'un diamètre donné. Il aurait été intéressant de percer des trous de petites dimensions, de l'ordre de 80 μm , les rapports signaux sur bruit eussent été meilleurs.

Le trou ayant été jugé acceptable, nous en mesurons l'aire. La mesure s'effectue à l'aide d'un réticule placé dans l'oculaire du microscope (grossissement de 100). Nous prenons deux diamètres, selon deux axes perpendiculaires, et calculons l'aire à l'aide de la formule de l'aire de l'ellipse. La précision obtenue est de l'ordre de 2%. La zone périphérique de la bicouche Montal-Mueller n'étant pas visible sous le stéréomicroscope (Wild-Heerbrugg, modèle M3B, Bâle, Suisse) avec un grossissement de 80 fois, nous avons posé l'aire de la bicouche égale à celle de l'orifice au travers duquel elle est formée, en augmentant l'incer-

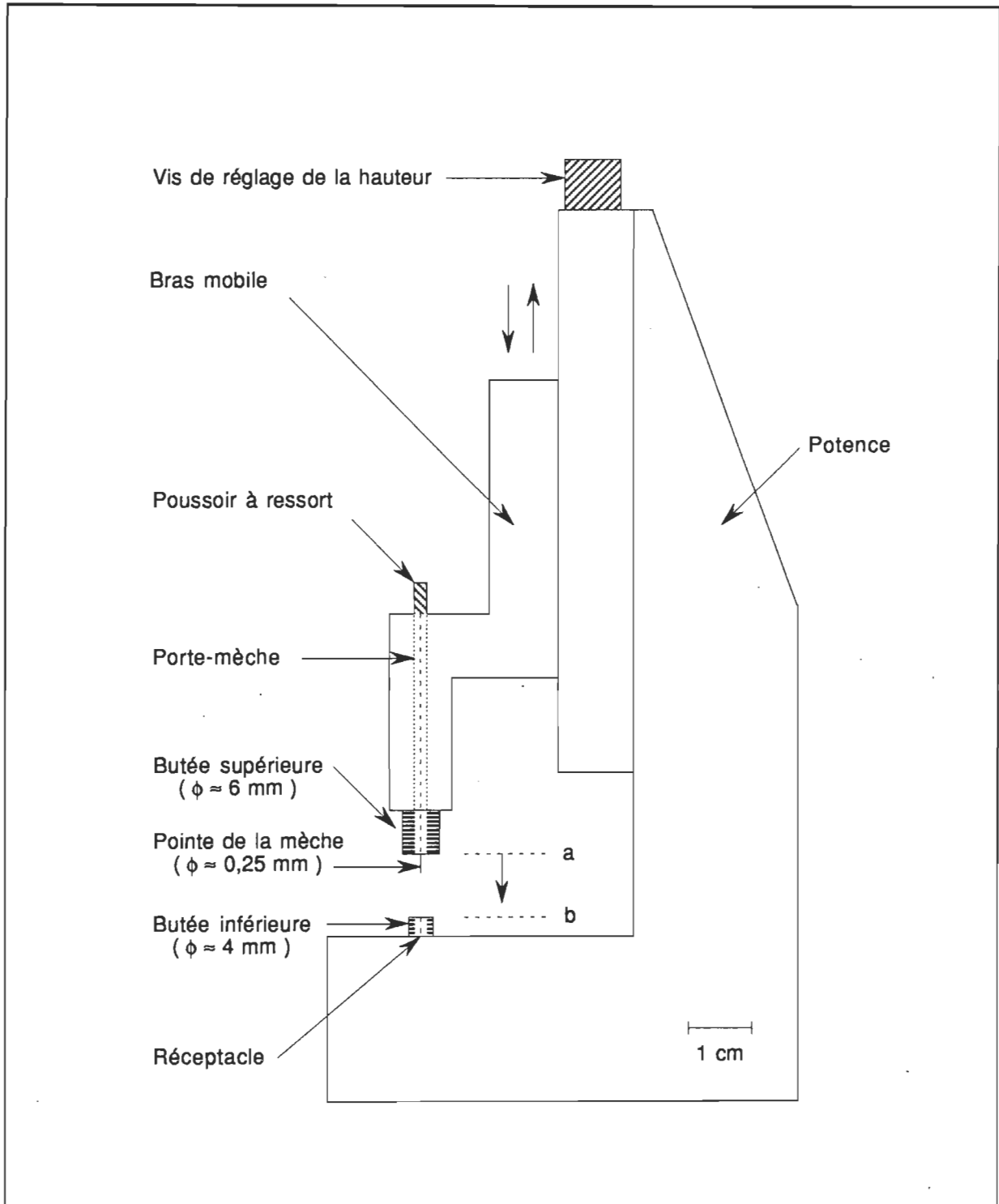


Figure 3.9. – Schéma de l'outil servant à la perforation de l'orifice (vue de côté). Une vis située dans la partie supérieure de l'outil permet d'abaisser la butée supérieure du point a au point b. (Pour une description du fonctionnement, se référer au texte.). Note: La pointe de la mèche est ici visible pour les besoins du dessin; elle demeure généralement invisible (position rétractée).

titude à 3% cependant. La capacité et la conductance de la bicouche étant proportionnelles à sa surface, la mesure de cette dernière se révèle nécessaire si nous voulons comparer les mesures électriques des bicouches formées au travers de différents orifices (ou d'un laboratoire à l'autre).

3.2.3 Conditionnement de l'orifice

Le conditionnement de l'orifice consiste à appliquer un enduit hydrocarboné sur le pourtour du trou. Comme l'ont démontré White & coll. (1976), à partir de la mesure d'angles de contact sur des gouttes, la présence de l'enduit est une condition sine qua non à la formation de bicouches Montal-Mueller stables. Parmi les quelque 250 articles ayant paru à ce jour sur la technique ³¹, un seul - l'exception qui confirme la règle ? - relate la possibilité de former des bicouches sans traiter l'orifice (Gambale & coll., 1987).

Parmi les enduits les plus communément utilisés, citons le squalène, l'hexadécane, la trioléide et la gelée de pétrole. De ces quatre, seuls les deux premiers (solution de squalène 2% (v/v) dans le pentane, solution d'hexadécane 0,5% (v/v) dans l'hexane) semblent s'imposer comme standards. Différents instruments sont utilisés pour appliquer l'enduit. Cela va de la microseringue au coton-tige, en passant par la micropipette et le vaporisateur.

Après différents essais (Tancredi & coll., 1983), nous avons retenu comme solution de conditionnement une solution 2% (v/v) de squalène dans l'hexane. Quant à l'instrument d'application, nous avons opté pour un pinceau d'artiste de taille 0 (Talens, modèle 191, Allemagne). Après avoir rincé le pinceau à l'hexane distillé, nous le trempions à peine dans la solution de squalène. Rapidement, mais avec doigté, nous badigeonnons le pourtour de l'orifice. Nous examinons ensuite le résultat au microscope. S'il y a trop d'enduit ou s'il n'est pas localisé sur tout le pourtour, nous devons nettoyer la bande de téflon à l'hexane et recommencer l'opération. Si le conditionnement de l'orifice est jugé réussi, nous passons à l'étape suivante: l'assemblage des bassins.

³¹ Le nombre de 250 correspond au nombre d'articles dont nous retrouvons parmi les citations soit l'article de Montal & Mueller (1972), soit l'article de Montal (1974). Source: Science Citation Index (1972-1989).

3.2.4 Assemblage des bassins et fabrication de la bicouche

Dans un premier temps, nous appliquons un lubrifiant à base de silicone (Dow Corning, Corning, NY) sur le fond de l'enceinte en plexiglas, sur la paroi mitoyenne de chacun des bassins et sur les faces internes du porte-membrane circulaire. Il faut éviter d'en mettre trop car alors les phases aqueuses pourraient en être contaminées, mais il faut en mettre suffisamment pour prévenir les fuites d'électrolytes entre les bassins cis et trans. On transfère ensuite, à l'aide de deux petites pinces à bouts plats, le support de téflon perforé du "porte-membrane" rectangulaire au porte-membrane circulaire, en ayant soin de positionner l'orifice légèrement au-dessus du centre de l'ouverture. Grâce à la graisse de silicone, le support adhère au porte-membrane. Il nous suffit alors de veiller à ce qu'aucun pli ne vienne froisser le mince film de téflon.

Nous insérons ensuite le porte-membrane dans l'enclave située entre les deux bassins. Puis, nous les accolons à l'aide d'une vis sans fin. Il faut éviter de serrer trop fort (les bassins se déformeraient et ne seraient plus étanches) mais il faut serrer suffisamment pour prévenir les fuites. (Comme quoi, une opération somme toute simple peut requérir une bonne dose d'expérience...). Nous ajustons ensuite la position du stéréomicroscope et nous vérifions l'éclairage. À ce propos, il nous est apparu qu'une bonne source de lumière provenant d'un illuminateur à fibre optique (PBL Electro-optics Inc, modèle QH-150, New London, NH) et dirigée verticalement au-dessus du porte-membrane permettait, de concert avec celle, arrière, provenant d'une source d'appoint (American Optical Corp, modèle 365, Buffalo, NY), un bon contraste de l'orifice, même submergé.

Nous remplissons ensuite chacun des bassins de la solution aqueuse désirée en ajustant les niveaux de liquide tout juste en dessous de la fenêtre du porte-membrane. Puis, nous laissons tomber les deux microbarreaux magnétiques dans les cavités prévues à cet effet. Ceux donnant la meilleure agitation sont de petits aimants à tête étoilée de 9 mm de diamètre (Nalge Company, # 6600-0010, Rochester, NY). Nous mettons ensuite en place le couvercle de plexiglas et les électrodes Ag/AgCl. On procède aux branchements et nous mesurons à l'aide de l'électromètre la résistance entre les deux électrodes. En général, nous mesurons des résistances entre 50 et 500 T Ω , conformément à ce que l'on peut calculer à partir de la résistivité du téflon et des dimensions du bain. Si la résistance n'est pas de cet ordre, mieux vaut recommencer à zéro.

L'étanchéité des bains étant vérifiée, nous nettoyons les deux surfaces d'étalement avec une pipette Pasteur reliée à la trompe à vide. Après avoir rincé la seringue de déposition (Hamilton, modèle 1710, Reno, Nevada) dix fois à l'hexane/éthanol 9:1 (v/v), nous étalons les films lipidiques à l'interface, à la manière des films monomoléculaires. La quantité déposée excède cependant celle requise pour former un film phospholipidique monomoléculaire. L'aire moléculaire moyenne se situe, en fait, entre 0,05 et 0,40 nm²•molécule⁻¹. Puis nous attendons vingt minutes afin que le solvant de déposition, l'hexane/éthanol 9:1 (v/v), s'évapore, nous assurant ainsi que les bicouches formées ne contiendront pas ou peu de solvant.

Le but approche... Nous remplissons les deux seringues en polypropylène jetables (Becton Dickinson & Cie, Rutherford, NY), de 10 à 30 ml de capacité, des solutions aqueuses cis et trans. Nous élevons doucement l'interface arrière (en général l'interface du bain trans) au-dessus du trou de 200 µm environ. Nous élevons finalement le niveau cis, en faisant perler les gouttes le long de la paroi de téflon (celle complètement à gauche, selon la figure 3.2). Des tubes capillaires, de diamètre intérieur égal à 1 mm, permettent un contrôle fin des gouttes délivrées. Le niveau de liquide en cis arrivant au niveau de l'orifice, la bicouche commence à se former. Nous pouvons suivre sa formation, soit visuellement (en observant les niveaux de liquide au stéréomicroscope), soit électriquement (en suivant les variations de capacité à l'oscilloscope). Si tout se déroule bien, la bicouche sera complètement formée lorsque le niveau du côté cis sera au-dessus du trou. Il s'agit alors d'ajouter encore un peu de liquide pour égaliser les deux niveaux et ainsi rendre nulle une différence de pression hydrostatique susceptible de bomber la bicouche, voire de la briser. Comme nous le verrons au prochain chapitre, la membrane ne se forme pas du premier coup... mais supposons que cela soit. Il nous faut alors entamer le dialogue, en clair mesurer les propriétés électriques de la bicouche.

3.2.5 Prise des mesures électriques

3.2.5.1 Circuit électrique équivalent du montage

La formation de la bicouche peut être suivie en mesurant la capacité existant entre les deux électrodes. La bicouche semble donc se comporter comme un condensateur. Cela s'explique si on examine la structure moléculaire d'une bicouche lipidique (ou d'une

membrane en général). La région centrale occupée par les chaînes aliphatiques des lipides constitue une zone isolante (de permittivité relative voisine de 2) alors que la région des têtes polaires (de permittivité supérieure à 30) fait office de plaque conductrice (voir figure 1.6). La structure membranaire étant bilipidique, nous avons donc une région isolante comprise entre deux régions conductrices. Notre bicouche (plane) peut ainsi être assimilée à un condensateur plan. Une formule bien connue en électrostatique nous permet de relier la capacité de la membrane aux données géométriques de celle-ci :

$$C_M = \frac{A_M \epsilon_0 \epsilon_{HC}}{\delta_{HC}} \quad [3.3]$$

- C_M : capacité de la bicouche Montal-Mueller (F)
- A_M : aire de la bicouche Montal-Mueller (m^2)
- ϵ_0 : permittivité du vide ($F \cdot m^{-1}$)
- ϵ_{HC} : permittivité relative du milieu hydrocarboné (-)
- δ_{HC} : épaisseur de la région hydrocarbonée (m)

La montée de capacité suivie à l'oscilloscope correspond à l'accroissement de l'aire de la bicouche. Lorsque nous atteignons le haut de l'orifice et que nous élevons encore les niveaux d'eau, la capacité varie très peu. Cela indique que la formation de la bicouche est terminée ($A_M = \text{constante}$).

La membrane n'est cependant pas un condensateur idéal; un certain courant, qu'on pourrait qualifier de courant de fuite, la traverse. La membrane possède donc une résistance électrique, certes très grande, mais non infinie. C'est pourquoi le comportement électrique d'une membrane est souvent approchée par un circuit équivalent composé d'une résistance et d'un condensateur en parallèle. Des études plus fines (Ashcroft & coll., 1977; 1981; 1983) montrent que la membrane peut être subdivisée en une série de petites régions (en général 5 ou 7) pouvant chacune être représentée par une résistance et un condensateur en parallèle. À une fréquence donnée, toutes ces associations résistance-condensateur peuvent être ramenées à un seul couple R-C en parallèle. L'équation 3.3 n'en demeure pas moins approximative car la capacité de la membrane (membre de gauche) n'est pas celle de la région hydrocarbonée (membre de droite). Si l'on tient compte des capacités et des résistances associées aux groupements acétyles et aux têtes polaires, la capacité totale d'une bicouche lipidique pure est environ 4% plus faible que celle de la région hydrocarbonée. En

associant, comme dans l'équation 3.3, capacité de la membrane et capacité du milieu hydrocarboné, nous ne faisons qu'une petite erreur (mais une erreur quand même).

L'association d'un condensateur et d'une résistance en parallèle se révèle un bon analogue électrique pour une foule de milieux et de matériaux. Le câble coaxial acheminant le signal de tension aux électrodes peut être remplacé par une résistance et un condensateur en parallèle, de même que l'électrode Ag/AgCl, la solution d'électrolyte, la couche immobile (Ashcroft & coll., 1977), la bicouche, la zone de transition ceinturant la bicouche, le support de téflon, le bain de bicouches, la couche immobile de l'autre côté de la bicouche, etc. Ce que mesure le pont d'impédance de capacité ou le circuit de mesure courant-tension correspond justement à cet ensemble de condensateurs et de résistances en parallèle. Le circuit équivalent complet du montage de bicouches Montal-Mueller peut être ramené à de plus justes proportions si l'on travaille à fréquence élevée ou en tension continue, certains éléments prenant le dessus sur d'autres.

3.2.5.2 Mesure de la capacité membranaire spécifique

Pour une fréquence fixe, le circuit équivalent du montage peut se ramener à un condensateur de capacité C_x et une résistance R_x en parallèle. Remplaçons le bain apparaissant à la figure 3.5 par cet équivalent. Lorsque nous équilibrons le pont d'impédance, la phase de la branche du haut est égale à celle du bas. L'impédance d'une capacité C à une fréquence angulaire ω étant égale à l'inverse du produit $\omega \cdot C$, il vient :

$$C_x = \frac{\omega R_x R_y C_y + \sqrt{(\omega R_x R_y C_y)^2 - 4 R_S (R_x + R_S)}}{2 \omega R_S R_x} \quad [3.4]$$

La détermination de C_x nécessite donc la connaissance de R_x . Celle-ci peut toutefois être mesurée à l'aide du circuit de mesure courant-tension, la résistance étant donnée par le rapport de la tension sur le courant. Lorsque $R_x \gg 1/\omega C_x$, l'équation 3.4 se ramène à :

$$C_x = \frac{R_y C_y}{R_S} \quad [3.5]$$

Si les bains sont étanches, $R_x \approx R_M$ et l'équation 3.5 est valide pour des résistances membranaires supérieures à 50 M Ω environ.

La capacité C_x incluant la capacité de la bicouche et des autres parties du montage, nous prenons deux mesures de C_x : l'une où les deux niveaux d'eau sont au-dessus de l'orifice (C_{P+M}), l'autre où l'un des niveaux est juste sous l'orifice (C_P); la différence représentant la capacité associée à la bicouche et à la zone de transition.

Ne connaissant pas a priori les valeurs de capacité de la bicouche nous avons cherché à calibrer le pont d'impédance. Nous avons d'abord mesuré à l'aide d'un pont d'impédance commercial (General Radio, modèle 1650-B, Concord, MA) une cinquantaine de condensateurs. Nous les avons ensuite séparés en deux groupes: ceux dont la capacité est de l'ordre de C_P et ceux dont la capacité, plus élevée, est de l'ordre de C_{P+M} . Nous les avons branchés en lieu et place des électrodes, mesuré R_y , calculé C_x à partir de 3.4, et calculé l'écart (Δ) avec la valeur mesurée par l'appareil commercial. Deux courbes de Δ en fonction de C_x furent tracées puis lissées à l'aide d'un polynôme. Nous avons ensuite placé les électrodes dans le bain et ajusté les niveaux d'eau tout juste au-dessus et en-dessous de l'ouverture. Nous avons mesuré C_P , puis calculé la valeur corrigée à l'aide des coefficients obtenus par régression polynomiale. Puis nous avons mis en parallèle avec les électrodes un condensateur de la série " C_{P+M} ", mesuré R_y , calculé C_x , la valeur corrigée de C_x et enfin l'écart avec la valeur mesurée par l'appareil commercial. Cette dernière valeur, inférieure à 7 pF, fut trouvée dépendante de la valeur de R_y associée à la capacité parasite C_P . Après calibration, la valeur de C_M est calculée d'après l'équation 3.6 :

$$C_M = C_{P+M} - C_P + \Delta_T \quad [3.6]$$

- C_M : capacité de la membrane (pF)
- C_{P+M} : capacité totale (pF)
- C_P : capacité associée au support et à l'ensemble du montage (pF)
- Δ_T : correction totale (pF)

où :

$$\Delta_T = \Delta_P - \Delta_{P+M} + \frac{R_P}{3}$$

- Δ_P : correction liée à la mesure de C_P (pF)
- Δ_{P+M} : correction liée à la mesure de C_{P+M} (pF)
- R_P : valeur de la résistance variable R_y lors de la mesure de C_P (k Ω)

La capacité de la membrane étant fonction de l'aire de celle-ci, il est courant dans la littérature de normaliser la capacité membranaire par unité d'aire. Cette nouvelle quantité est généralement appelée capacité membranaire spécifique.

$$C_S \equiv \frac{C_M}{A_M} \equiv \frac{\epsilon_0 \epsilon_{HC}}{\delta_{HC}} \quad [3.7]$$

- C_S : capacité membranaire spécifique ($F \cdot m^{-2}$)
 C_M : capacité de la membrane (pF)
 A_M : aire de la membrane (m^2)

3.2.5.3 Mesure de la conductance membranaire spécifique

La mesure de conductance statique s'effectue en courant continu. L'impédance des différentes capacités est par conséquent infinie et le circuit équivalent du montage ne comporte que des résistances. La résistance des fils, des électrodes et du milieu électrolytique étant de plusieurs ordres de grandeur plus petites que celle, en série, associée à la bicouche, à la zone de transition et au support hydrophobe, nous ne tenons compte que de cette dernière et puisque les résistances associées à la bicouche, à la zone de transition et au support sont en parallèle, seule la valeur des plus faibles importe, c.-à-d. celle associée à la bicouche et à la zone de transition. Nous pouvons donc écrire : $R_X \approx R_M$.

Nous disions, à la section 3.1.2.2, que le courant était donné par la tension à la sortie du convertisseur I-V divisée par la résistance de contre-réaction. Si nous mesurons la valeur de la tension à la sortie du canal 1 lorsque nous appliquons de part et d'autre de la membrane une tension V_i , nous aurons :

$$I_M = -\frac{V_o}{G R_f} = \frac{V_i}{R_M} \quad [3.8]$$

- I_M : courant traversant la membrane (A)
 V_o : tension à la sortie du canal 1 (V)
 R_f : résistance en contre-réaction (Ω)
 G : gain du canal 1 (-)

La conductance statique de la membrane est donnée par l'équation 3.9 :

$$G_M \equiv \frac{I_M}{V_i} = -\frac{V_0}{V_i} \cdot \frac{1}{G R_f} \quad [3.9]$$

et la conductance (statique) spécifique par 3.10 :

$$G_s \equiv \frac{G_M}{A_M} \quad [3.10]$$

Effectuons maintenant un balayage en tension avec une fréquence de l'ordre du mHz. Nous aurons une courbe I-V linéaire si la conductance membranaire ne dépend pas de la tension appliquée (comportement ohmique). Sinon, la courbe I-V sera sub- ou superlinéaire selon que la courbe s'éloigne de l'axe des tensions ou des courants. La fréquence du signal n'étant plus nulle, notre courbe montrera une hystérèse due au courant capacitif. La valeur de la capacité membranaire étant de l'ordre de 300 pF, ce courant ne sera perceptible que sur des échelles de courant de l'ordre du pA.

Nous avons testé le circuit de conductance à l'aide d'analogues membranaires constitués d'un condensateur et d'une résistance en parallèle. À la **figure 3.10** apparaît la courbe I-V d'un analogue d'une bicouche phospholipidique pure (" C_{P+M} " = 380 pF, " R_M " \approx 100 G Ω). Le condensateur est un condensateur en polystyrène de grande précision (Rifa Electronics, modèle PFE 210, Stockholm, Suède); la résistance, une résistance scellée sous vide (Victoreen, modèle RX-1, Cleveland, OH). Nous avons mesuré l'analogue membranaire à l'aide de trois "picoampèremètres": l'amplificateur opérationnel AD42K avec une résistance de contre-réaction de 100 G Ω (sensibilité de 10 pA \cdot V $^{-1}$), le même amplificateur avec une résistance de contre-réaction de 10 G Ω (sensibilité de 100 pA \cdot V $^{-1}$), puis l'électromètre Keithley 617.

En ce qui concerne la valeur de la résistance mesurée (valeur de la pente), aucun instrument ne se démarque. Concernant la réponse en fréquence, l'AD42K avec un R_f de 10 G Ω l'emporte de peu sur l'électromètre. Par contre, au niveau du rapport signal sur bruit, la palme revient à l'ampli avec un R_f de 100 G Ω tandis que le R_f de 10 G Ω prend le dernier rang. Mais même avec ce R_f l'amplificateur peut mesurer à 100 mV une résistance d'une centaine de G Ω avec un rapport signal sur bruit de 100. Les performances du circuit réalisé au laboratoire et de l'électromètre sont, en définitive, comparables et nous avons donc utilisé les deux instruments sans faire de distinction majeure.

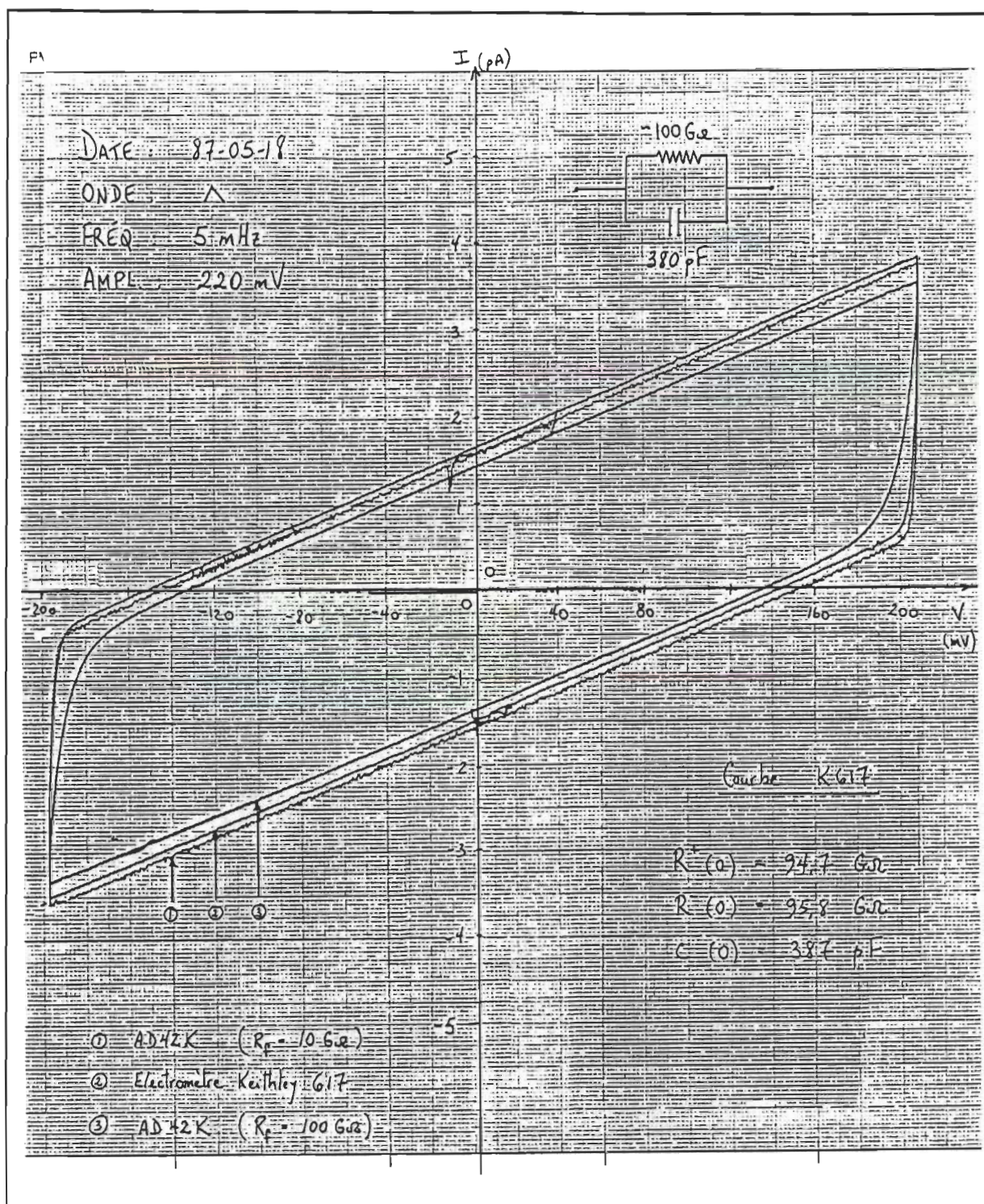


Figure 3.10. – Caractéristiques I-V d'un circuit électrique simulant une bicouche lipidique: performance comparée des instruments de mesure du courant. Le circuit analogue est constitué d'une résistance de $100 \text{ G}\Omega$ et d'un condensateur de 380 pF en parallèle. Les courbes 1 et 3 réfèrent au montage réalisé au laboratoire (AD42K - Annexe 2); la courbe 2, à l'électromètre Keithley 617.

3.2.5.4 Méthodologie de la prise de mesure

Reprenons maintenant où nous avons laissé tantôt, reprenons donc le "dialogue" avec la bicouche Montal-Mueller nouvellement formée. Nous avons suivi la formation de la bicouche phospholipidique via la mesure de capacité. La bicouche étant encore fragile, nous nous contentons de suivre la mesure de capacité pendant les quinze premières minutes. Si celle-ci s'écarte des valeurs attendues pour une bicouche ou si la capacité augmente ou diminue rapidement (voir critères à la **figure 3.11**), et si nous ne pouvons par un moyen ou un autre revenir à la valeur normale, nous devons briser la bicouche et en refaire une nouvelle. Si la bicouche se comporte normalement, nous passons à la prochaine étape: la mesure de la conductance statique sous une faible tension (de l'ordre de 20 à 50 mV). Pour ce, nous devons actionner un interrupteur, et si le saut de tension est trop brusque, la membrane peut briser. Même si on utilise un interrupteur moulé à même le téflon et que l'on passe d'une tension rms à une tension continue de même valeur, il arrive que la membrane casse lors du changement de position de l'interrupteur.

Supposons que la membrane résiste. Nous enregistrons alors, pendant une période d'environ quinze minutes, le courant en fonction du temps. Si celui-ci tourne autour du picoampère et qu'il n'y a pas tendance à la hausse, nous procédons à un balayage en tension. Là aussi, nous devons actionner une commande pour passer d'une tension fixe à une rampe de tension. Là aussi, il faut éviter les sauts de tension et il faut éviter de plus de "visiter" des tensions élevées pendant les premiers cycles I-V ("la bicouche n'aime pas qu'on la brusque"). Par contre, il ne faut pas attendre trop longtemps pour vérifier si la bicouche est capable de supporter des tensions de l'ordre de 150 mV (la bicouche possède une durée de vie limitée).

Supposons que la conductance de la bicouche n'augmente pas exagérément avec la tension et que la pente près de l'origine demeure à peu près la même. Nous continuons alors le "dialogue" en revenant à la mesure de courant sous faible tension. Si la bicouche n'a pas encore cassé, c'est bon signe. Nous démarrons alors l'agitation dans chacun des bassins à l'aide d'une commande située à l'extérieur de la cage de Faraday. Si la conductance demeure stable sous l'agitation, nous passons à l'ajout de nonactine dans chacune des phases aqueuses. L'utilisation d'une microseringue à bout métallique est ici à éviter. Le simple fait de toucher l'interface - l'interface exempte de lipides ! - suffit souvent à faire

casser la bicouche. Les résultats sont meilleurs toutefois si l'on emploie une pipette Eppendorf (modèle 4780, Brinkmann Instruments, Westbury, NY) munie d'un petit capillaire en téflon et si l'expérimentateur se met à la terre. Les premières minutes suivant l'injection de nonactine sont critiques. Il arrive souvent que la montée de la conductance membranaire se termine par un bris de la membrane. Si cela arrive, il est préférable de prendre une bonne respiration, vider les bassins et reprendre à zéro.

Supposons que la bicouche soit toujours présente suite à l'ajout du transporteur. Nous attendons alors que la conductance se stabilise et nous nous préparons pour la courbe courant-tension. L'expérimentateur doit faire preuve à ce moment d'un bon jugement. À partir du comportement de la bicouche depuis sa formation, à partir de la manière dont la bicouche a été formée, à partir des résultats sur les bicouches précédentes, à partir aussi du nombre de minutes depuis la formation de la bicouche, à partir des résultats d'expériences passées dans des conditions similaires, l'expérimentateur doit choisir l'amplitude et la fréquence de l'onde triangulaire. Si l'on est trop conservateur, la bicouche casse sans que l'on ait pu balayer suffisamment large en tension et si l'on est trop audacieux, la bicouche casse avant même qu'un demi-cycle I-V ne soit enregistré. Dans les deux cas, il faut se retrousser les manches et tenter le coup de nouveau.

3.2.6 Extraction de la barrière d'énergie

Les courbes I-V furent enregistrées en balayant de la manière la plus ample possible. Nous pouvons ainsi plus facilement tester le modèle théorique et, dans le cas où celui-ci tient, mieux cerner le profil de potentiel trapézoïdal. En explorant le domaine des tensions élevées, nous forçons la membrane à montrer ses couleurs, pourrions-nous dire de manière imagée.

Les courbes I-V qui furent traitées ont toutes une amplitude dépassant les 150 mV. Six d'entre elles ont été acquisitionnées à l'aide du programme AQIV. Pour ces dernières, 10 000 points ont été moyennés par groupe de 10 (1000 points apparaissent donc dans le fichier de sortie du programme IDEV). Pour les autres, plus anciennes ou tirées de la littérature, une soixantaine de points ont été mesurés à l'aide d'une règle à partir d'agrandissements des tracés originaux. Pour les trois courbes montrant une légère hystérèse (de l'ordre de 3%), un seul demi-cycle fut traité.

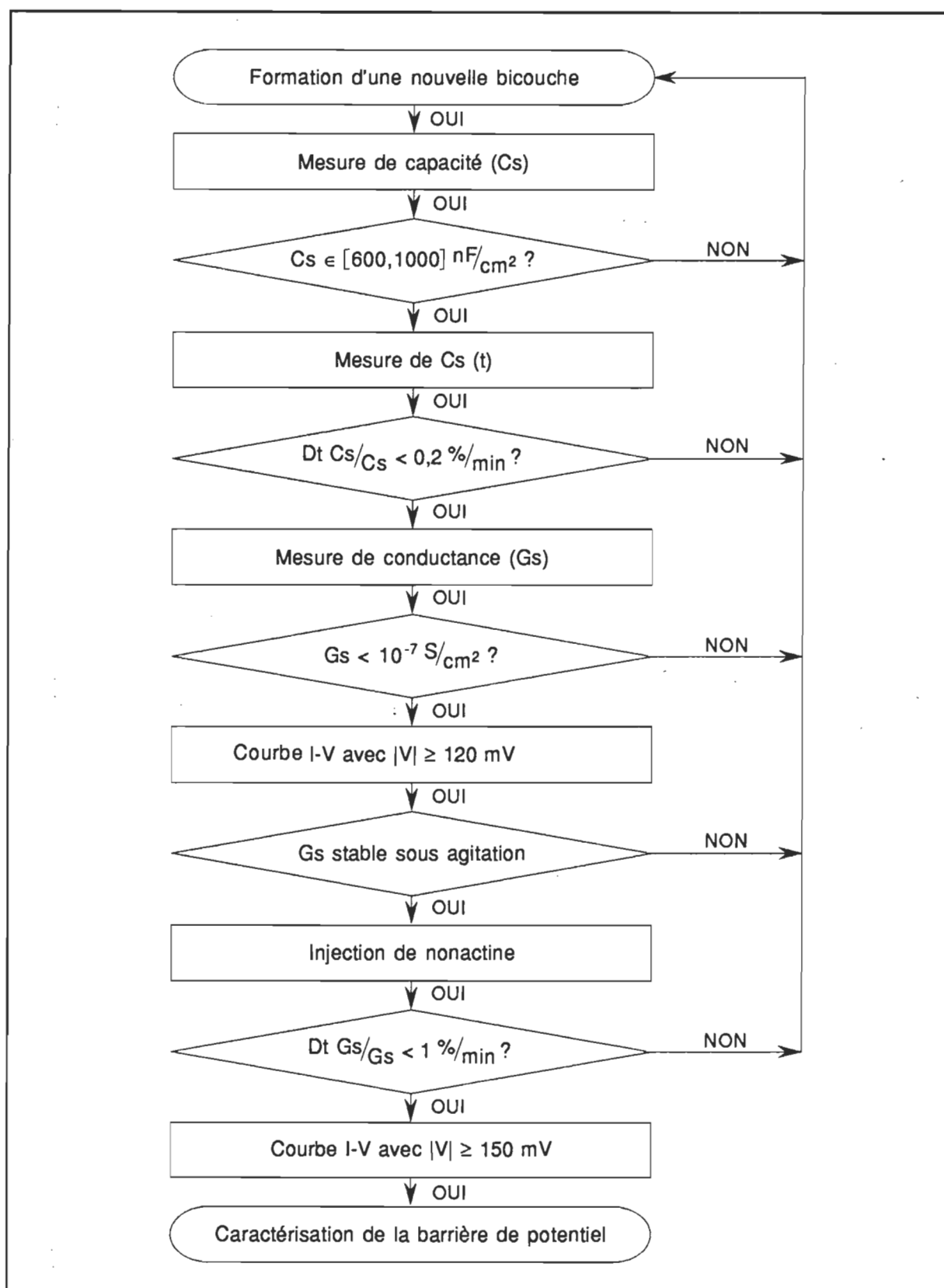


Figure 3.11. – Protocole, sous forme d’algorithme, de la prise de mesures des propriétés électriques membranaires. Signalons que la bicouche formée est susceptible de se briser à chaque étape marquée d’un rectangle. Le cas échéant, il faut prendre la voie de droite appelée aussi la voie de garage.

Le programme TPZIV a comme fichiers d'entrée le fichier de sortie de IDEV (contenant les couples I,V expérimentaux) et un fichier contenant différentes données expérimentales (telles l'aire de la bicouche, les concentrations de transporteur, de l'ion K^+ , la température, etc.). Dans un premier temps, le programme calcule la constante K_{NP} à partir des équations 2.27 et 2.35 (le coefficient de partage et la constante de complexation furent choisis égaux sur chacune des interfaces). Dans un deuxième temps, le programme approxime les couples I,V expérimentaux à la fonction I(V) donnée à l'équation 2.35.

Deux voies s'offraient à nous: la régression non linéaire et une approche que l'on pourrait qualifier de combinatoire. La première utilise des algorithmes numériques, tels la méthode de Levenberg-Marquardt et la méthode du gradient (Ralston & Rabinowitz, 1978, § 8.8) pour rechercher par itération les coefficients (ici en l'occurrence les paramètres ψ_1 , $\Delta\psi$, n_1 et n_2); la deuxième consiste à faire varier tous les paramètres et conserver la ou les combinaisons de paramètres qui approximent le mieux la courbe. Dans les deux cas, le critère des moindres carrés est utilisé. Les techniques de régression font varier par itération les paramètres de manière à minimiser les moindres carrés alors que pour l'approche de "balayage", il faut trier les différents carrés afin de conserver le moindre (par carrés, l'on entend la somme, sur l'ensemble des points, des carrés des écarts entre le point expérimental et le point correspondant prédit par la fonction).

Bien que reconnaissant l'élégance des techniques de régression, nous avons choisi la méthode "combinatoire", d'une part parce qu'elle est plus facile à mettre en oeuvre mais aussi parce qu'il est difficile avec les méthodes itératives de déterminer l'erreur sur les coefficients (la librairie statistique IMSL, pour l'une, n'offre pas de routines permettant l'exercice).

Nous retrouvons donc dans le programme TPZIV (la liste des instructions du programme apparaît à l'annexe 3) six boucles imbriquées: cinq faisant varier les paramètres K_{NP} , ψ_1 , $\Delta\psi$, n_1 et n_2 ; et une, intérieure, pour la tension V. Nous entrons en interactif les valeurs maximales et minimales que peuvent prendre chacun des paramètres, de même que l'incrément du paramètre. À la fin de la boucle intérieure, la racine de la somme des carrés des résidus est divisée par le nombre de points. Cette quantité, que nous avons symbolisée par la lettre τ , correspond à l'écart-type. Si τ est inférieur à une valeur prédéterminée, τ_{\max} (de l'ordre de 1% de la valeur moyenne des extrémums de courant), le programme conserve

dans un fichier de sortie la valeur numérique des cinq paramètres ayant produit la courbe I-V, sinon il "oublie" cet ensemble de paramètres. Il "essaie" ensuite un nouvel ensemble de paramètres, calcule le nouveau τ , compare avec τ_{\max} , passe au prochain ensemble de paramètres, calcule τ , et ainsi de suite. À la fin de toutes les boucles, une série d'instructions permet de classer, par ordre ascendant de τ , toutes les combinaisons de paramètres dont les τ sont inférieurs à τ_{\max} .

Dans un premier temps nous faisons varier les paramètres sur une large étendue avec des incréments grossiers et un τ_{\max} élevé, question de se faire une idée de l'espace-solution. Puis selon les résultats, nous changeons les limites (l'étendue des paramètres), nous choisissons de plus petits incréments et nous restreignons τ_{\max} . Nous arrivons ainsi à déterminer une série de profils trapézoïdaux approximant bien la courbe I-V expérimentale. Si nous choisissons un τ_{\max} égal à l'erreur expérimentale, nous pouvons, à partir de la liste des "combinaisons gagnantes", estimer l'erreur sur chacun des paramètres.

Vu les capacités de calcul limitées des micro-ordinateurs, nous avons employé certains artifices de programmation dans le but d'accélérer le processus d'évaluation des paramètres. De quelques jours, au début, nous pouvons maintenant à l'aide du programme TPZIV, en une dizaine d'heures, extraire d'une courbe I-V l'étendue des valeurs possibles des quatre paramètres ψ_1 , $\Delta\psi$, n_1 et n_2 (K_{NP} est généralement tenu constant) avec une précision de 1 mV pour ψ_1 , 0,5 mV pour $\Delta\psi$, et 0,01 pour n_1 et n_2 . Notons que pour une courbe I-V sans "bruit" (c.-à-d. produite par l'équation 2.35), le programme retrouve rapidement et précisément les paramètres originaux.

3.3 Matériel et produits

3.3.1 Eau

L'eau utilisée pour la préparation des solutions salines est d'abord filtrée dans un système de filtration (Sybron/Barnstead, modèle NanoPure, Boston, MA) composé d'une série de quatre filtres. Le premier élimine les résidus organiques, les deux suivants, constitués de résines, fixent les ions inorganiques et le dernier retient toute particule excédant 0,2 μm . L'eau est ensuite distillée dans un appareil à double distillation en quartz (Heraeus

Quarzschmelze, modèle Bi18 T, Hanau, Allemagne) et recueillie dans des contenants spécialement prévus à cet effet. La résistivité spécifique de l'eau distillée est supérieure à 17,5 Mohm•cm (conductimétrie) et sa tension superficielle supérieure à 71 mN/m (méthodes de la montée capillaire de Jurin, de l'anneau de Du Nouy et de la lame de Wilhelmy).

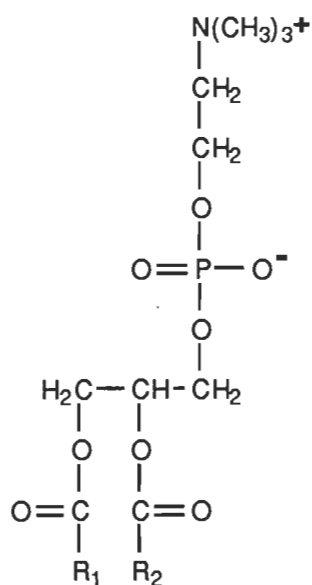
3.3.2 Produits chimiques

3.3.2.1 Sels

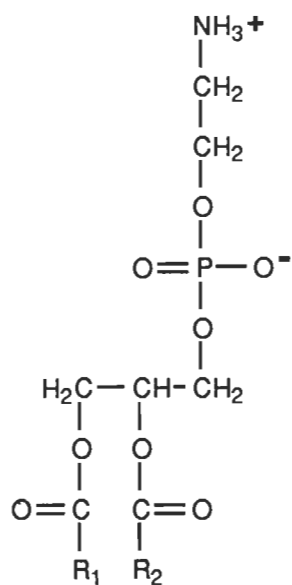
Les sels de phosphate (Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4), nécessaires à la préparation du tampon du même nom, proviennent de la compagnie J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ). Ces sels sont de grade réactif de même que le chlorure de sodium (NaCl) acheté à la même enseigne. Les chlorures de lithium (LiCl) et de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) proviennent de la compagnie BDH Chemicals (grade AnalaR, Toronto, Ont) alors que le chlorure de potassium (KCl) fut acheté chez Anachemia (grade réactif, Champlain, NY). Ces sels n'ont fait l'objet d'aucune attention particulière.

3.3.2.2 Lipides

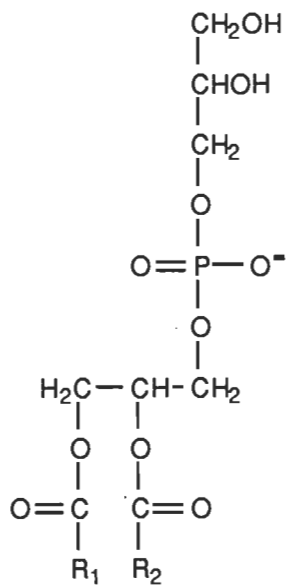
Les résultats reportés dans cette étude portent tous sur des bicouches formées à partir de films phospholipidiques. Intéressés par le potentiel transmembranaire créé par une asymétrie de charges, nous avons fabriqué des bicouches asymétriques dont l'on retrouve d'un côté un phospholipide zwitterionique (PE, PC) et de l'autre côté un lipide chargé (PS, PG). Nous étalions par exemple, à l'interface du bain cis, un film de PE (phospholipide neutre) et sur le bain trans un film de PS (phospholipide chargé). En élevant les niveaux d'eau au-dessus de l'orifice (voir figure 1.6), nous formions une bicouche asymétrique, notée PE/PS (lipide déposé du côté cis à gauche, lipide déposé du côté trans à droite). Des bicouches symétriques (PE/PE, PS/PS, etc.) furent également formées afin de mettre au point et de tester mesures et méthodologies. La structure des principaux phospholipides utilisés apparaît à la **figure 3.12**. Les chaînes aliphatiques sont simplement représentées par R_1 et R_2 .



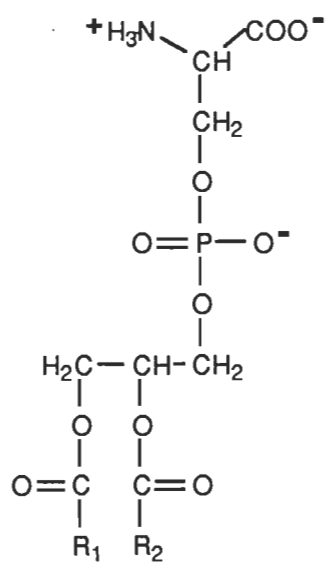
Phosphatidylcholine
(PC)



Phosphatidyléthanolamine
(PE)



Phosphatidylglycérol
(PG)



Phosphatidylsérine
(PS)

Figure 3.12. – Structure de la tête polaire des principaux phospholipides utilisés. Les lettres R_1 et R_2 symbolisent les deux chaînes aliphatiques des phospholipides.

Les premières bicouches furent formées à partir de phospholipides d'origine naturelle, soit la phosphatidyléthanolamine de coeur de boeuf (Serdary Research Laboratories, London, Ontario) et la phosphatidylsérine de cerveau de boeuf (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). Un autre échantillon de PS, hydrogénée en laboratoire (Pharmacia P-L Biochemicals, Milwaukee, WI), fut également utilisé à la même époque. Les mesures de capacité des bicouches PE/PS montrant de grandes variations que nous avons peine alors à comprendre, nous avons opté par la suite pour des phospholipides synthétiques dont les chaînes hydrocarbonées sont identiques et bien caractérisées. Parmi les principaux lipides de synthèse utilisés, citons la DOPE (1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoryl-1'-*sn*-éthanolamine) et la DOPC (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL), le DOPG (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) et la DOPS (courtoisie du Dr. John Silvius, Université McGill, Montréal, Qc): quatre phospholipides dont les chaînes aliphatiques sont constituées de 18 atomes de carbone et possédant une insaturation de type *cis* entre les atomes numérotés 9 et 10 (chaînes oléoyl). Nous avons également utilisé un lipide éthéré à chaînes mixtes, le 1-oléoyl, 2-palmitoylphosphatidylcholine (Serdary Research Laboratories, London, Ontario), que nous noterons PC-éther pour alléger l'écriture.

Préparation des solutions lipidiques

Les lipides sont d'abord pesés sous atmosphère d'azote sur des microbalances précises au μg près (Ventron Instrument Corp., Cahn modèle RG 2000, Cerritos, CA; Sartorius, modèle M25D, Göttingen, Allemagne). Le lipide et la petite cupule d'aluminium servant à la pesée sont ensuite introduits dans de petits flacons en verre de 3,5 ml (Pierce Chemical, Rockford, IL). Un volume d'hexane-éthanol 9:1 (v/v), le solvant de déposition, est ensuite ajouté de manière à ce que la concentration du phospholipide se situe entre $3 \cdot 10^{16}$ et $1,2 \cdot 10^{17}$ molécules /100 μL (entre 0,5 et 2 mM). Les flacons sont ensuite hermétiquement fermés à l'aide d'un bouchon-valve Mininert (Pierce Chemical, Rockford, IL). Ces bouchons nous permettent de prélever à la seringue des volumes de la solution de lipides sans exposer la solution à l'air ambiant. Les solutions lipidiques sont ensuite conservées au congélateur (-20°C) pour une période ne dépassant pas un mois ou deux. Notons que le mélange hexane-éthanol 9:1 constitue un excellent solvant de déposition. Il est moins dense que l'eau, pratiquement immiscible avec cette dernière et très volatil.

3.3.2.3 Autres produits

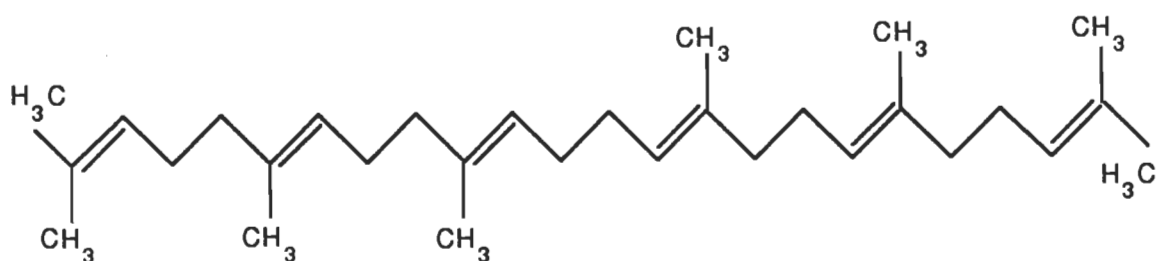
La nonactine utilisée dans cette étude provient de la compagnie Sigma (St-Louis, MO). Elle fut pesée à la microbalance tel qu'indiqué au paragraphe précédent. La nonactine est ensuite mise en solution dans l'éthanol à une concentration de l'ordre de 0,5 mM. L'incertitude sur la concentration-mère est inférieure à 1%. Par contre, l'incertitude sur la concentration de nonactine dans la phase aqueuse est beaucoup plus grande (environ 8%) vu les faibles volumes ajoutés (de l'ordre de 100 μ L) et l'absence d'un contrôle précis du volume de la phase aqueuse dans chacun des compartiments.

Le squalène provient de la compagnie Eastman Kodak (Rochester, NY). Il fut utilisé tel quel sans procédure de purification particulière. Sa structure chimique et certaines de ses propriétés apparaissent à la **figure 3.13**.

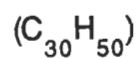
3.3.2.4 Solvants, bases et acides

Tous les solvants utilisés dans cette étude (chloroforme, éthanol, éther éthylique, hexane, méthanol) furent distillés sur des colonnes Vigreux de 45 cm de hauteur (Fisher Scientific Co, Montréal, Qc). Ces solvants de grade spectroscopie provenaient des compagnies Anachemia (Anachemia Canada, Ville St-Pierre, Qc) et BDH (Toronto, Ont). Des tests d'étalement sur bain de Langmuir ont démontré que ces solvants ne contenaient pas d'agents tensioactifs.

Différentes bases et acides furent utilisés lors de la préparation des électrodes et lors du nettoyage du bain de bicouches. L'acide sulfurique provenait de la compagnie Anachemia, l'acide chlorhydrique de la compagnie Aldrich (Milwaukee, WI) et l'acide nitrique de la compagnie Fisher. L'hydroxyde de sodium et la base ammoniacale provenaient également de la compagnie Fisher Scientific. Tous ces produits étaient de grade réactif.



Squalène



Masse moléculaire	: 410,73 u
Longueur (dépliée)	: 2,9 nm
Point de fusion	: < -20 °C
Concentration en masse	: 858,4 kg•m ⁻³ (20°C)
Viscosité dynamique	: 25 mPa•s (25°C)

Figure 3.13. – Structure et principales caractéristiques du squalène (principal agent conditionneur utilisé dans l'étude).

Résumé

Le montage décrit dans le présent chapitre fut en grande partie conçu et réalisé au laboratoire. Il s'est avéré performant et facile d'utilisation. Par rapport aux montages existants dans le domaine, notre système se distingue au premier chef par la présence d'une paroi divisant l'interface air-eau en deux parties: l'une occupée par le film lipidique, l'autre servant aux différentes manipulations. Il se distingue aussi par l'utilisation d'un porte-membrane servant à maintenir fixe le support entre les deux bassins, et qui, de plus, élimine pratiquement tout risque de contamination des phases aqueuses par la substance isolante. Soulignons aussi le travail effectué relativement à la perforation de l'orifice. Grâce à l'instrument décrit à la section 3.2.1, des orifices circulaires, lisses et de même dimension, ont pu être percés.

Les circuits électroniques réalisés permettent la mesure de la capacité et de la conductance de la bicouche à 1% près. Ceci se compare avantageusement à ce qui se fait dans les autres laboratoires où les bicouches planes sont à l'étude. Mentionnons finalement que ces mesures furent traitées par une batterie de programmes informatiques conçus sur place et qui possèdent toute la flexibilité et la spécificité voulues.

CHAPITRE IV

OBSERVATIONS

4.1 Formation de la bicouche Montal-Mueller

Au chapitre III, nous avons décrit les différentes étapes à suivre pour former une bicouche Montal-Mueller. La minutie avec laquelle ces étapes doivent s'effectuer a pu paraître exagérée, mais il n'en est rien. Il suffit, par exemple, de créer un petit pli lors de l'adhésion de la bande de téflon sur le porte-membrane pour que nos chances de former une bicouche soient réduites à néant. Il suffit également d'une petite échancrure sur le pourtour de l'orifice pour rendre une agréable journée d'expérimentation pareille à une infernale corvée. Les étapes préparatoires doivent être effectuées consciencieusement, et avec optimisme et confiance aussi, car même lorsque toutes les conditions semblent réunies, il arrive encore que l'on s'acharne toute une journée sans que l'on puisse former une seule bicouche.

À la suite du conseil de Montal (1974, p.552) : “ *The more membranes you form, the more stable they will be* ”, Hansen (1978, p.44) y allait du sien: “ *The more one attempts to form the bilayers, the easier they are to form* ”. Il est vrai que lorsqu'une bicouche vient récompenser de vaillants efforts, certains gestes prennent de l'importance et sans que l'expérimentateur n'en prenne vraiment conscience, il aura tendance à répéter ces gestes par la suite. “Le métier entre dans le corps”, comme le dit l'adage mais cette méthode d'apprentissage n'est sûrement pas la plus efficace. Aux conseils de ces fiers artisans des

bicouches Montal-Mueller, nous pourrions en ajouter un: “ *The more we understand how bilayers formed, the easier we will be able to form them* ”.

Que savons-nous du mode de formation des bicouches Montal-Mueller ? Peu de choses. Montal, en 1974, fit un schéma représentant une bicouche en voie de formation. On y aperçoit (voir **figure 4.1**) un premier film monomoléculaire, à droite, couvrant tout l’orifice, puis un second film monomoléculaire s’y adjoignant. La formation de la bicouche est simplement décrite par une apposition des chaînes aliphatiques. En 1976, White & coll., dessinèrent une série de schémas rendant compte du fait que l’apposition des chaînes n’est possible qu’en présence de l’enduit hydrocarboné. Une zone périphérique contenant ledit enduit est clairement représentée. En 1978, Hansen consacra cinq pages de sa thèse de doctorat sur la formation de la bicouche Montal-Mueller. Des observations qui y sont rapportées, celles concernant les derniers instants avant la formation complète de la bicouche nous semblent les plus importantes. Nous y reviendrons plus loin. Aucun schéma ne cristallise ses observations cependant. Finalement, contre toute attente, Niles & coll. en 1988, signent un article entièrement consacré au mode de formation de la bicouche Montal-Mueller. Selon les auteurs, la bicouche Montal-Mueller se formerait selon un processus d’amincissement semblable au film bilipidique noir ! (Nous reviendrons sur cette étonnante hypothèse.)

Nous n’aurons pas ici la prétention d’expliquer de quelle manière la membrane se forme. L’objectif de ce chapitre serait plutôt de consigner certaines observations reliées à la formation de la bicouche, de les rendre accessibles afin que notre compréhension du phénomène soit facilitée et qu’éventuellement, dans un proche avenir espérons-le, émerge une explication satisfaisante.

Il nous apparaît important de partager ces informations afin de dissiper quelque peu l’aura de mystère entourant les bicouches Montal-Mueller; de faire état d’une situation, plutôt que se cantonner en terrain connu et deviser en circuit fermé comme cela est généralement le cas. La politique de l’autruche - celle de l’avare? -, coûteuse en sous et en temps, nous semble incompatible avec une activité scientifique véritable.

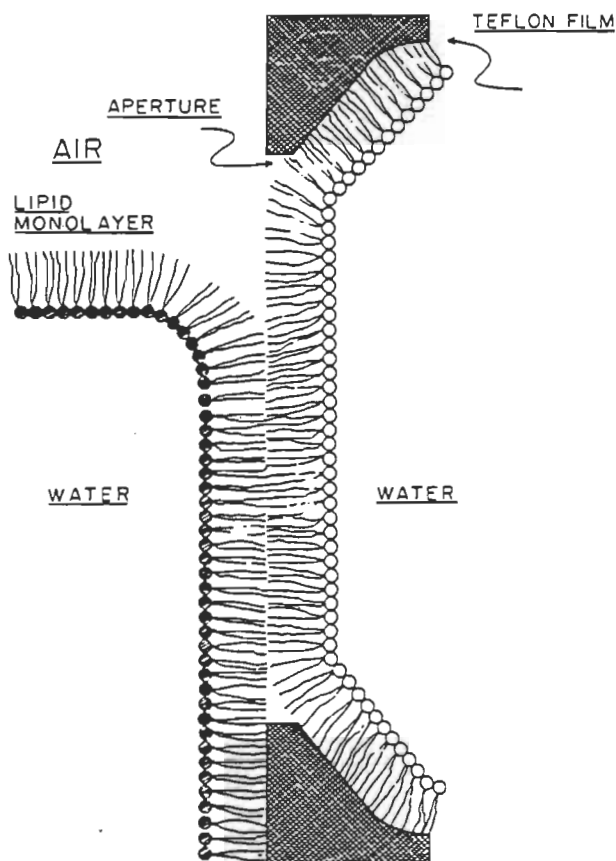


FIG. 1. Principle of bilayer formation by the apposition of two lipid monolayers at an air-water interface. The shading of the polar head groups of one monolayer indicates a different chemical composition and the consequent formation of an asymmetric bilayer. One monolayer is first adjoined to the septum, and then the second one. Not drawn to scale.

Figure 4.1. – Mode de formation d'une bicouche Montal-Mueller. Schéma original de Montal. (Tiré de Montal, 1974).

4.1.1 Jeu des niveaux d'eau

Nous faisons état à la section 3.2.5 de la difficulté de mesurer à notre guise les propriétés électriques d'une bicouche Montal-Mueller. Nous aimerions ici faire ressortir le fait que former cette bicouche n'est pas en soi chose acquise. La bicouche Montal-Mueller est fragile, disions-nous. Elle est encore plus fragile lorsque nous la formons, et de beaucoup ! Le moindre faux geste, le moindre faux pas, la moindre vibration peut suffire à tuer la bicouche dans l'oeuf. Chaque goutte d'eau que nous laissons tomber à l'interface génère une onde de choc qui se répercute à l'endroit où se forme la membrane bilipidique, une onde susceptible de briser la structure en formation. C'est la principale raison pour laquelle nous avons songé à placer une paroi de téflon de 5 mm d'épaisseur entre l'endroit où nous laissons tomber les gouttes et celui où est étalé le film multilipidique. C'est aussi pour atténuer l'onde de choc (se propageant sous la paroi) que nous avons eu l'idée de faire descendre sur la paroi du bain de fines gouttes de liquide. Mais, même en procédant ainsi nous ne réussissons pas à éliminer entièrement l'onde de choc. Elle devient seulement comparable à celle produite par une personne se déplaçant dans une pièce attenante.

Avant de faire l'acquisition d'un stéréomicroscope, nous ne pouvions suivre la formation de la bicouche qu'en visualisant la sortie du pont de capacité sur l'oscilloscope. Lors de nos premiers essais, il était question de montée douce de la capacité, d'augmentation rapide ou, plus fréquemment, de bris de la membrane (dans ce cas, le pont de capacité devient impossible à équilibrer). Avec le temps, l'expérience - le métier, disions-nous -, le vocabulaire s'est élargi et l'élévation des niveaux d'eau est devenue une opération complexe.

Revenons à l'onde de choc causée par l'addition d'une goutte de liquide. Cette onde suffit à imprimer un mouvement d'oscillation à la membrane, mouvement se traduisant par un tremblement plus ou moins important du signal à l'oscilloscope. L'aspect du signal à l'oscilloscope est donc devenu rapidement une source d'information de première main. Par lui, nous pouvions estimer la fragilité mécanique de la bicouche en voie de formation. Dépendamment de l'effet de la dernière goutte sur le signal, nous jugions s'il était préférable ou non de rajouter une autre goutte. Dépendamment de la variation de la capacité, et de la valeur de celle-ci suite à l'ajout de cette goutte, nous pouvions estimer l'avancement de la formation de la bicouche, et ce, toujours dans le but de choisir le

meilleur moment pour ajouter une autre goutte. Et ainsi de suite jusqu'à ce que la capacité ne varie plus. Selon le lipide, le comportement de la bicouche précédente, le comportement de la bicouche en formation, il ressortait que, dans certaines situations, il était préférable d'y aller rondement (la bicouche semblant "attendre" la prochaine goutte) alors que pour d'autres il fallait procéder lentement (la bicouche semblant prendre un certain temps pour "absorber" la hausse du niveau d'eau). Avec l'expérience, nous prenions de meilleures décisions mais il n'empêchait que certaines journées, le taux de réussite demeurait désespérément bas.

Comme les autres utilisateurs de la technique, nous élevions, abaissions, ré-élevions chacun des niveaux d'eau jusqu'au moment où une bicouche daignait se former. Nous pouvions ainsi élever le niveau d'eau cis puis le trans, redescendre le niveau cis suivi du trans, ré-élever le niveau trans et former une bicouche en ré-élevant le niveau cis. Nous pouvions tout aussi bien élever *rapidement* les niveaux d'eau cis et trans, redescendre *tranquillement* les niveaux cis et trans, ré-élever *tranquillement* le niveau trans et former une bicouche en ré-élevant *rapidement* le niveau cis. La séquence des étapes pouvait varier à l'infini. Le plus étonnant, c'est que nous pouvions former une bicouche en laissant un niveau d'eau au-dessus de l'orifice et en abaissant et remontant une seule interface. Fabriquions-nous alors des bicouches asymétriques ? En principe, la technique permet de fabriquer des bicouches de composition asymétrique, mais en pratique est-ce le cas ? Est-ce *toujours* le cas ?

De la simple mesure de capacité, nous ne pouvions répondre à cette dernière question, pas plus que nous pouvions expliquer le fait qu'il suffise d'élever un seul niveau d'eau pour former une bicouche, question plus fondamentale encore. Le schéma donné à la **figure 4.2** représente peut-être bien la réalité lorsque nous fabriquons une membrane au premier essai, mais que se passe-t-il à la seconde ou à la dixième tentative ? À la lumière de ces quelques lignes, notre projet visant à mesurer les potentiels transmembranaires prend une importance indéniable.

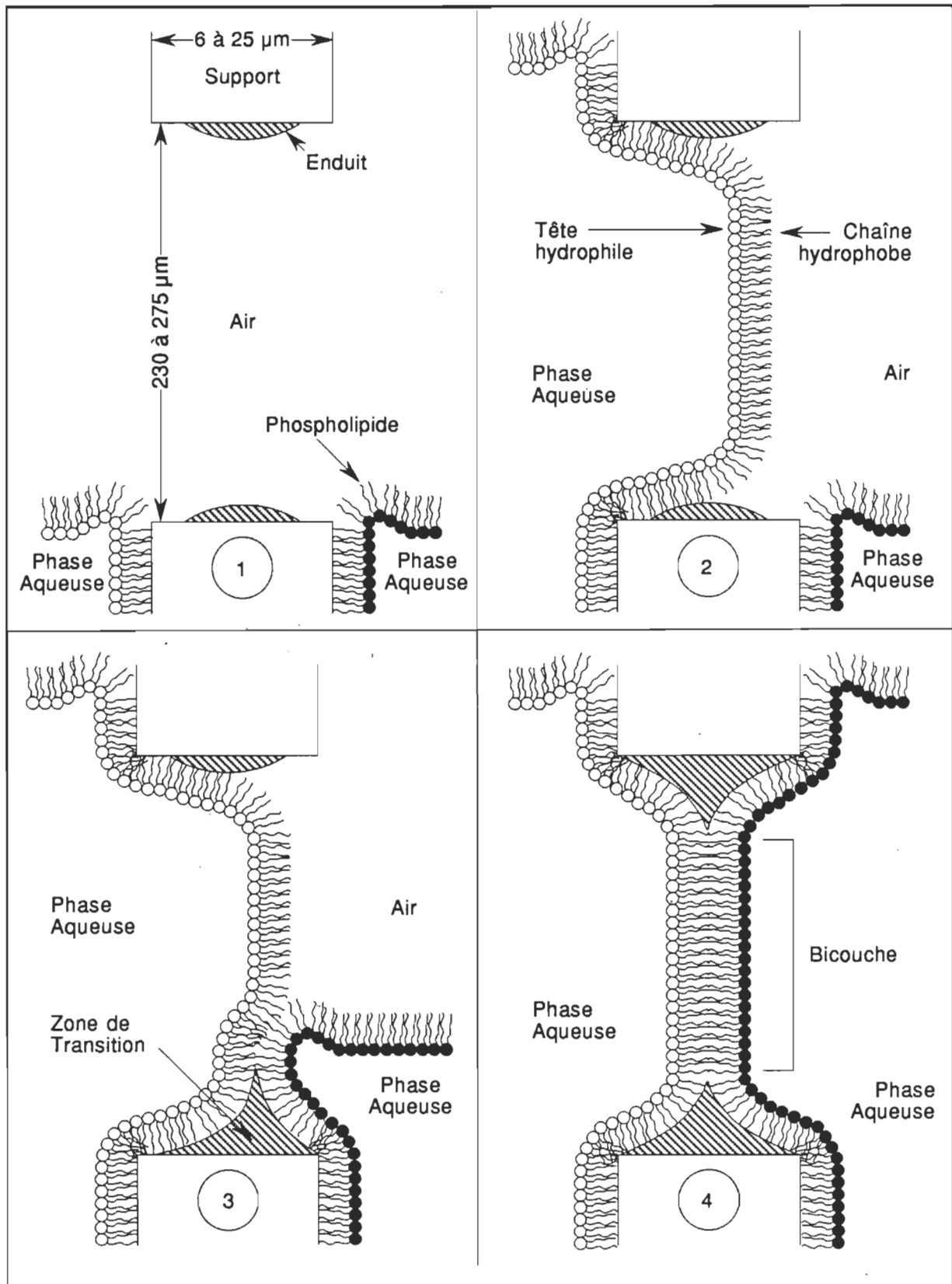


Figure 4.2. – Mode de formation d'une bicouche Montal-Mueller. Les quatre diagrammes ne sont pas dessinés à l'échelle. (Inspiré de White & coll., 1976).

4.1.2 Observations au stéréomicroscope

L'acquisition d'un stéréomicroscope s'est révélée très rentable. D'une part, pour améliorer notre point de vue sur le mode de formation mais aussi pour améliorer notre taux de réussite. Avant même d'élever les niveaux d'eau, nous pouvons voir grâce au pouvoir grossissant du stéréomicroscope une petite fibre sur les abords de l'orifice ou encore une goutte de squalène modifiant de manière défavorable le ménisque à l'interface. Plutôt que de s'obstiner les yeux rivés à l'oscilloscope toute la journée, plutôt que de se perdre en de moléculaires conjectures, il nous suffit maintenant de corriger la situation d'un coup de pinceau ou à l'aide d'un jet d'azote bien dirigé. Des journées de travail ont pu être sauvées de cette façon.

L'observation au stéréomicroscope nous a non seulement permis d'expliquer pourquoi il était impossible (ou difficile) de former des bicouches certaines journées, mais aussi pourquoi nous mesurons parfois de petites valeurs de capacité (jusqu'au tiers de la capacité normale). Le 23 juillet 1986, nous observions, après avoir descendu un niveau d'eau, un agrégat de matière de nature inconnue coincé dans la partie supérieure de l'orifice. En relevant le niveau d'eau, nous réussissons, sans difficulté majeure, à fabriquer une bicouche. Fait intéressant, nous mesurâmes une valeur de capacité plus faible que la bicouche formée auparavant, et ce, d'une quantité correspondant, grosso modo, à la surface de l'agrégat observé. En manipulant les sources d'éclairage, nous aperçûmes le même agrégat, toujours présent dans la partie supérieure de l'orifice. L'agrégat s'est ensuite déplacé légèrement vers le haut et la bicouche s'est brisé à ce moment. Ce qu'il faut retenir ici, c'est qu'il a suffi de quelques minutes d'observations pour rationaliser des mesures de capacité trop faibles et des bris de membranes, qui autrement, seraient demeurés inexplicables.

4.1.2.1 Observations reliées au mode de formation.

Reprenons le dessin #4 apparaissant à la figure 4.2. Que se passe-t-il si l'on rabaisse les niveaux d'eau ? Revient-on à la case initiale (dessin #1) ? Des observations au stéréomicroscope nous forcent à répondre par la négative. Du moins, lorsque nous observons dans ces conditions une pellicule couvrant tout l'orifice. White & coll. (1976) observèrent également cette structure pelliculaire. Selon les auteurs, il s'agirait d'une goutte

d'eau recouverte sur les deux surfaces d'un film monomoléculaire de lipides, d'une structure en définitive semblable à une pellicule de savon.

Fait intéressant, nous pouvons former une pellicule en élevant et en rabaissant un même niveau d'eau. Observation supplémentaire: des particules de quelques micromètres de diamètre peuvent se déplacer au sein de cette pellicule. Quels sont les constituants de cette pellicule ? de ces particules mobiles ? Y retrouve-t-on des lipides déposés à l'interface des bassins cis et trans ?

Si on remonte puis redescend rapidement un des deux niveaux d'eau, on peut briser la pellicule, libérant ainsi l'orifice. En éclatant la pellicule donne naissance à une ou le plus souvent à deux gouttelettes d'apparence huileuse. Ces deux gouttelettes, d'une cinquantaine de microns de diamètre, se fixent en général de part et d'autre de l'orifice, un peu au-dessus du centre de l'ouverture (un étudiant à l'imagination fertile y aurait vu les oreilles de Mickey Mouse). En remontant un niveau d'eau (situation équivalente au dessin #2), les deux gouttelettes se rassemblent vers l'intérieur de l'orifice. Nous voyons un film (monomoléculaire?) couvrant la majeure partie de l'orifice et, dans la partie inférieure, une "lentille" de nature lipidique réfléchissant bien la lumière. En élevant le second niveau (situation équivalente au dessin #3), la lentille se déplace vers le haut de l'orifice. Lorsque le niveau atteint le haut de l'ouverture, la lentille se détache de l'interface et migre plus ou moins rapidement vers le film multimoléculaire à l'interface (du côté que l'on vient d'élever). Sous de bonnes conditions d'éclairage, on peut distinguer encore la lentille à l'interface. Ses dimensions semblent correspondre à celle que l'on obtiendrait en sommant les deux "gouttelettes-oreilles". En remontant alternativement le même niveau, les mêmes étapes se reproduisent: formation de la pellicule, éclatement en deux gouttelettes, réunion en une seule lentille, montée de la lentille et migration de la lentille à l'interface (27 juin 1988). La forte réflexion de la "lentille", le fait qu'elle conserve ses dimensions tout au long de l'élévation du second niveau nous laissent à penser qu'il s'agit bien d'une gouttelette d'huile et non pas d'un volume d'eau recouvert d'un film lipidique monomoléculaire.

Deux questions se posent: la lentille est-elle impliquée dans le processus de formation de la bicouche proprement dit ? Si oui, formons-nous bien des bicouches asymétriques ?

La présence d'une pellicule au travers de l'orifice n'est pas observée systématiquement mais, lorsqu'elle est observée, elle est souvent associée à des difficultés de formation. En effet, lorsque la pellicule est présente dans l'orifice, le second niveau a tendance à trop mouiller au niveau de celui-ci. Nous avons ainsi un ménisque normal sur le support de téflon, mais dès que l'interface touche le bas de l'orifice, nous assistons à une montée trop rapide de l'interface; le niveau "décroche" vers le haut et la structure présente dans l'orifice se brise, soit à cause de l'afflux rapide de liquide, soit parce que la structure s'échafaudant ne peut résister à la différence de pression hydrostatique entre les deux compartiments.

Une seconde difficulté survient lorsque l'on abaisse le dernier niveau levé. On a beau retirer du liquide dans ce compartiment, descendre et descendre le niveau d'eau, le film semble adhérer sans fin à l'orifice. Bien que l'interface soit en dessous de l'orifice (parfois même en dessous de la fenêtre! -, nous avons un contact électrolytique là où, généralement, on ne devrait pas en avoir. Cela soulève évidemment quelques inquiétudes.

Afin de remédier à ces difficultés, nous avons pris l'habitude de descendre les deux niveaux sous l'orifice et de détruire la pellicule à l'aide d'un jet d'azote. Dernièrement, pour ne laisser aucune place au hasard, nous avons convenu de ne faire qu'une seule tentative pour former la bicouche. Nous élevons le niveau trans, puis très tranquillement - presque religieusement - le niveau cis. Si l'essai rate, il nous faut reprendre du tout début. Evidemment, si nous pouvions faire des centaines d'essais par jour dans le passé, cette façon de faire nous limite à deux ou trois essais seulement.

Est-il possible de faire des bicouches dès le premier contact entre les films lipidiques ? Contrairement à ce qui avait été avancé précédemment au laboratoire (Houle, 1982; Paquin, 1983), il est possible de fabriquer des membranes au premier essai. Le faible nombre de membranes obtenues ne permet pas malheureusement de les distinguer de celles formées après plusieurs essais.

4.1.3 Effet de fermeture

L'observation de la mesure de capacité nous apporte aussi de précieuses indications sur le mode de formation de la bicouche. Dans un article que nous avons publié il y a quelque temps (Brullemans & Tancrède, 1987), nous faisions état d'un curieux phénomène se

produisant lorsque la bicouche est pratiquement toute formée. Si l'on trace la capacité mesurée en fonction du volume de liquide ajouté dans le second compartiment (voir figure 1, annexe 4), nous obtenons une courbe grossièrement biphase. La capacité croît d'abord rapidement lorsque le ménisque du second niveau atteint l'orifice, puis devient ensuite plus graduelle. Lorsque le niveau atteint le haut de l'orifice, nous notons une hausse rapide suivie d'une chute brusque de capacité. La capacité prend alors une valeur stable compatible avec celle attendue d'un condensateur à plaques parallèles dont la permittivité relative du milieu diélectrique serait comprise entre 2 et 3 et dont l'épaisseur serait d'environ 3 nm. Il est à noter que le profil et l'amplitude du "pic" de capacité sont extrêmement variables. Parfois la chute brusque de capacité correspond à 50% de la valeur finale de capacité, quelques fois elle est indétectable ($< 0,5\%$). Parfois la partie ascendante du phénomène de fermeture nécessite l'ajout d'un volume égal au dixième du volume total des bains; parfois quelques gouttes suffisent. Quant à la chute de capacité, elle se produit généralement dans l'ordre de la seconde mais il se peut qu'elle dure cinq ou six secondes.

En regardant simultanément au microscope, nous avons pu établir la simultanéité entre la chute brusque de capacité et le "détachement" de la "lentille" de la partie supérieure du trou, tel que décrit à la section précédente. Par contre, il serait audacieux d'affirmer qu'il existe une relation entre l'amplitude de la chute de capacité et la dimension de la "lentille". Il serait également prématuré d'affirmer, vu les conditions d'éclairage difficiles à obtenir, qu'une absence de chute de capacité corresponde à une absence de "lentille" trappée dans l'orifice.

Deux auteurs ont pris la peine de noter ce curieux phénomène (augmentation et brusque chute de capacité): d'abord Hansen (1978) qui utilisa, à la page 63 de sa thèse, le terme « closing-off phenomenon » ; Schindler (1989) parla plutôt de « locking in », laissant entendre qu'à ce moment la bicouche prend une configuration stable. (En ce qui nous concerne, nous utiliserons le terme général d'effet de fermeture). À la page 64 de la thèse de Hansen, nous pouvons lire:

"As the aqueous pocket separates from the aperture edge, the capacitance decreases until normal bilayer values are reached. Under some conditions a multi-layered film forms across the aperture instead of a bilayer and this is probably related to the aqueous pocket bounded by lipid."

Hansen observe un phénomène semblable à celui que nous apercevons et il semble indiquer que le phénomène peut être très complexe. Quant à Schindler (p.237), il affirme, sans aucun argument à l'appui, que "*this decrement reflects the locking in of the bilayer into its minimum area configuration within the hole.*" Il ajoute néanmoins que certaines bicouches ne montrent pas de telles chutes de capacité. Rappelons ici que l'auteur fait implicitement référence à des bicouches de même composition lipidique, et limitées par les mêmes phases aqueuses...

4.2 Stabilité et facilité de formation des bicouches

Nous avons discuté jusqu'à maintenant de la formation d'une bicouche typique dans des conditions typiques. En fait, il est difficile de trouver une telle bicouche. L'on a beau contrôler les conditions extérieures, élever les niveaux d'eau avec une pompe péristaltique; une bicouche n'est jamais vraiment semblable à aucune autre. Chaque bicouche est phénomène et elle possède son histoire propre. Sans entrer toutefois dans ces fins détails, nous allons rapidement examiner ici certaines particularités touchant la facilité de formation et la stabilité d'une bicouche, de composition donnée, dans un environnement donné. Bien que cette bicouche et cet environnement forment un tout indivisible, nous allons, vu nos données encore bien fragmentaires, discuter successivement de l'effet de la nature du lipide, de l'enduit et du support hydrophobe.

4.2.1 Nature du lipide

Les lipides peuvent se diviser en trois catégories: ceux qui mouillent normalement le téflon (nous nous limiterons ici à ce type de support), ceux qui le mouillent difficilement et ceux qui le mouillent de manière exagérée. Ceux de la première catégorie s'organiseront facilement pour former des bicouches alors que les autres seront plus difficiles à manoeuvrer. Ceux qui mouillent peu le support (les "réticents") grimpent difficilement le long du support (ménisque de faible amplitude ou négatif). Il nous faut donc ajouter un grand volume d'eau pour amorcer la formation mais, lorsque la pression hydrostatique devient trop élevée au niveau du ménisque, celui-ci décroche brusquement et l'afflux de liquide brise la bicouche en formation. Ceux qui mouillent trop (les "enthousiastes") ne

requièrent qu'une petite quantité d'eau pour s'apposer dans l'orifice, mais alors c'est la *différence* de pression hydrostatique entre les deux compartiments qui gâche tout.

Des lipides, tels le DOPE, DOPC, DOPG, DOPS, mouillent correctement le téflon, tout comme les phospholipides PE et PS d'origine naturelle. La PC éthérée et le phosphatidylinositol de foie de boeuf (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL) mouillent plus difficilement mais il demeure possible de former des bicouches constituées de ces seuls constituants. Par contre, le DPPC et la DPPE mouillent négativement le téflon et nous n'avons pu former de bicouches à partir de films de ces deux derniers lipides. Il est intéressant de noter que ces deux lipides ne forment pas de pellicule au centre de l'orifice. Selon Boheim & coll. (1980), le DPPC ne forme pas de bicouches Montal-Mueller stables parce que la structure du phospholipide ne permettrait pas une interdigitation des chaînes aliphatiques originant des deux feuilletts. Nos vains efforts pour fabriquer des bicouches DPPE/DPPE semblent accréditer leur hypothèse.

Si l'on classe les lipides selon leur charge nette, il appert que les films de phospholipides zwitterioniques, PE et PC (hormis la PC-éther), mouillent mieux le téflon que les films anioniques, PG, PS et PI. Il est ainsi plus facile de former des bicouches DOPE/DOPE que de former des bicouches DOPS/DOPS. En ce qui concerne les bicouches asymétriques, du type DOPE/DOPS par exemple, elles sont plus faciles à former que celles fabriquées à partir de deux films négativement chargés. Ainsi si l'on considère les deux seuls lipides DOPE et DOPS et que nous élevons le niveau cis en dernier lieu, nous avons, par ordre croissant de facilité: DOPS/DOPS, DOPS/DOPE, DOPE/DOPS et DOPE/DOPE. Il est à noter que nous avons pu former au laboratoire des bicouches préparées à partir d'un lipide cationique, le diméthyl dioctadécylammonium (Eastman-Kodak, Rochester, NY), et d'un lipide anionique, la DOPS. À ce que nous sachions, cette formation d'une bicouche constituée exclusivement d'un lipide anionique d'un côté, et exclusivement d'un lipide cationique de l'autre, constitue une première.

Ces dernières observations ne demeurent valables que si les lipides sont bien conservés. Comme le note Hansen (1978) à la page 78: "*as oxidation of the unsaturated phospholipid occurs, the bilayers are unstable and difficult to form*". Laisser une solution lipidique de DOPE ou de DOPC trop longtemps à la température de la pièce conduit à nous retrouver avec des lipides à classer dans la catégorie des "réticents" !

À l'inverse, il fut trouvé que l'ajout d'une certaine quantité d'hexane à l'interface amenait un mouillage beaucoup plus régulier, beaucoup plus net. Dans ces conditions, des bicouches PS/PS et PI/PI deviennent plus faciles à former. Une équipe suisse (Schoch, Sargent & coll.) use souvent d'un procédé similaire; les chercheurs étalent leurs lipides à l'interface et élèvent immédiatement les niveaux d'eau, sans permettre l'évaporation du solvant de déposition. Certains de leurs résultats prêtent toutefois flanc à la critique vu la grande quantité de solvant susceptible de se retrouver à l'intérieur de leurs bicouches. En ce qui nous concerne, aucune mesure ne fut prise sur des bicouches formées en présence d'hexane.

Une observation plus générale a trait à la déposition de mélanges lipidiques à l'interface. Il nous a semblé qu'il était plus aisé de former des bicouches à partir de mélanges de lipides qu'à partir de films lipidiques purs. À prime abord, cela peut paraître paradoxal; ainsi, il semble plus facile d'échafauder une structure répétitive formée d'un seul élément qu'une structure constituée d'éléments différents. Mais, imaginons que nous exerçons une contrainte sur un système dans le but de l'organiser. Si le système est complexe, il aura plus de "flexibilité" pour réagir "adéquatement" à la contrainte mais s'il est constitué des mêmes éléments, il sera "limité" dans son évolution. L'explication est très sommaire mais permet de rationaliser aussi le fait qu'il est plus facile de former des bicouches à partir d'un lipide naturel (comprenant de nombreuses espèces lipidiques) qu'à partir d'un lipide synthétique (une seule espèce de lipide). De même, il est plus facile de former des bicouches à partir d'un lipide à chaînes insaturées (pouvant prendre de nombreuses configurations) qu'à partir d'un lipide saturé, tel le DPPC.

Il est commun dans la littérature de lier facilité de formation et stabilité de la bicouche³¹ mais il faut éviter d'en tirer une règle absolue. Combien de bicouches avons nous formées facilement mais qui n'ont duré que le temps d'un soupir ! En fait, il serait plus prometteur de corréler facilité de formation et durée de vie *possible* de la bicouche. Mais pour sortir du domaine du qualitatif et aller au domaine du quantitatif, il faudrait établir des critères de

³¹ Une bicouche est dite stable si elle résiste à différentes perturbations. Si ces perturbations varient peu en fonction du temps, la stabilité de la bicouche peut être estimée à l'aide du temps de vie de la bicouche.

"facilité de formation", établir une méthodologie adéquate et faire une analyse statistique des résultats obtenus. Nous sommes loin de la coupe aux lèvres...

4.2.2 Nature de l'enduit

La qualité de l'application de l'enduit peut faire toute la différence entre un essai fructueux et un essai voué à l'échec. Cela ne se reflète pas seulement au niveau de l'adjonction des feuillets lipidiques dans l'orifice mais aussi au niveau de la qualité du mouillage de chacun des films lipidiques. Nous venons tout juste de discuter de l'importance du contact entre le film multilipidique et le support de téflon; or, les gouttelettes de squalène (ou d'un autre enduit) peuvent modifier considérablement l'aspect du ménisque. Les films lipidiques ayant une forte affinité pour le squalène, les gouttelettes "attirent" l'interface, le déforment, causant les problèmes de mouillage décrits plus haut. Des gouttelettes de squalène se retrouvant jusqu'à un millimètre, à gauche ou à droite, de l'orifice peuvent constituer des sources de problèmes.

Pour y remédier, il nous faut une bonne technique d'application (voir section 3.2.3) mais aussi un enduit s'étalant de manière optimale sur le pourtour du trou. Un enduit qui mouille bien les micro-anfractuosités existant sur le rebord de l'orifice mais qui ne s'étend pas démesurément sur le support hydrophobe. Outre l'enduit standard (squalène 2% (v/v) dans l'hexane), trois types d'enduits furent essayés: la gelée de pétrole, une solution de squalane 1% (v/v) dans l'hexane et une solution de trioléide 1% (v/v), dans l'hexane toujours. En ce qui concerne la gelée de pétrole, nous avons eu de la difficulté à en étendre de petites quantités sur le pourtour du trou. De plus les bicouches semblaient plus difficiles à former. Le squalane donne de bons résultats. Il s'applique bien et adhère bien au téflon. Quant à la trioléide, molécule de glycérol estérifiée par trois acides oléiques, elle mouille insuffisamment le téflon, se désorbant dès l'arrivée du niveau d'eau. Une concentration plus faible de trioléide donnerait peut-être de meilleurs résultats.

Avant l'acquisition du stéréomicroscope, il existait de ces périodes où seuls des déplacements brusques des niveaux permettaient la formation d'une bicouche. Rétrospectivement, il semble plausible qu'en remuant ainsi les interfaces nous repoussions quelques malencontreuses gouttelettes de squalène (mélangé aux lipides?) au-delà de l'orifice. À l'aide du stéréomicroscope, il suffit maintenant, avant de tenter la formation de

la bicouche, d'approcher du support un mince pinceau bien sec et de retirer les gouttelettes excédentaires. Des journées de travail ont pu être sauvées, disions-nous...

4.2.3 Nature du support

Différents supports ont été testés au laboratoire; parmi ceux-ci, mentionnons les supports de polycarbonate, de polypropylène et de polytétrafluoroéthylène (téflon). Aucune membrane n'a pu être formée sur le support de polycarbonate. Les deux autres supports permettent la formation de bicouches. Une étude comparative de ces deux types de support fut publiée en 1983 par Tancrede & coll. Il en ressort que les bicouches PE/PS formées sur support de polypropylène sont moins stables que celles formées sur un support de téflon. Elles sont également plus difficiles à former car l'angle de mouillage entre le film lipidique et le support est plus faible (Paquin, 1983).

La nature du support se révèle importante mais son procédé de fabrication également. Le mouillage d'un film de PE sur un bande de téflon fondu "unilamellaire" (Fluorofilm Dilectrix Division, "type C") est supérieur à celui sur une bande de téflon fondu "multilamellaire" (Fluorofilm Dilectrix Division, "type DF-100"). Comme nous pouvions nous y attendre, il est aussi plus difficile de former des bicouches sur les supports de téflon du type DF-100 que sur ceux du type C.

4.3 Retour sur le mode de formation de la bicouche Montal-Mueller

Que ce soit via le type de lipide utilisé, d'enduit ou de support, il est clair que le taux de succès de formation de la bicouche Montal-Mueller dépend étroitement de l'angle de contact entre le film lipidique et le support hydrophobe. Mais cela nous éclaire-t-il sur le mode de formation de la bicouche ?

Bien peu. Le mystère demeure. White & coll. (1976), par ailleurs bien volubiles, demeurent évasifs concernant la pellicule "savonneuse". Hansen (1978) décrit bien le phénomène de fermeture mais n'ose se prononcer sur l'implication au niveau du mode de formation. Que se passe-t-il lorsqu'une bicouche est formée au deuxième essai ? Se formerait-elle comme l'avancent Niles & coll. à la façon d'une BLM ? Nous en doutons.

Selon Niles & coll. (1988), les films multilipidiques à l'interface "balaieraient" les gouttelettes d'enduit lors de la montée des niveaux d'eau. Ces gouttelettes se condenseraient pour n'en former qu'une seule, obstruant l'orifice. Cette goutte serait "protégée" du milieu aqueux par une couche monomoléculaire de lipides. Une fois les deux niveaux au-dessus de l'orifice, nous aurions une goutte d'enduit hydrocarboné limitée de chaque côté de l'orifice par un film monomoléculaire. Nous aurions en fait une bicouche pleine de solvant. (Le diagramme de formation de la bicouche selon Niles & coll. est reproduit à la **figure 4.3**).

Photomicrographies à l'appui, les auteurs décrivent le processus d'amincissement d'une bicouche d'asolectine formée au travers d'un trou de 160 μm préalablement enduit de squalène. Ce processus, soulignent les auteurs, est en tout point analogue à celui d'un film noir. Sur une de leurs figures, apparaît la montée de capacité accompagnant le processus d'amincissement. D'une durée de l'ordre de cinq secondes, la montée de capacité prend grossièrement la forme d'une sigmoïde et ne montre ni hausse, ni chute brusque, à la fin de la montée... Or Schindler (1989) affirme que l'effet de fermeture ne peut se produire qu'à la condition que le rapport entre le diamètre de l'orifice et l'épaisseur du support soit supérieur à 10. Il ajoute - malicieusement! - que si cet effet n'est pas présent, nous ne pouvons affirmer avec certitude avoir formé une bicouche Montal-Mueller. En se rapportant aux spécifications données par Niles & coll., nous obtenons des valeurs comprises entre 1 et 5. Que penser alors du titre de l'article de Niles & coll.: *Planar bilayer membranes made from phospholipid monolayers (sic) form by a thinning process* ? Les bicouches planes formées par Niles & coll. peuvent-elles être comparées aux bicouches Montal-Mueller "traditionnelles" ?

Les auteurs, bien qu'étant parmi les pionniers à fabriquer des bicouches Montal-Mueller, écrivent aussi: "*It is a common observation that the growth in capacitance lags, rather than occurs simultaneously with, the raising of both monolayers above the hole*". Jamais nous n'avons observé ce délai et, à ce que nous sachions, personne n'a à ce jour fait référence à ce délai.

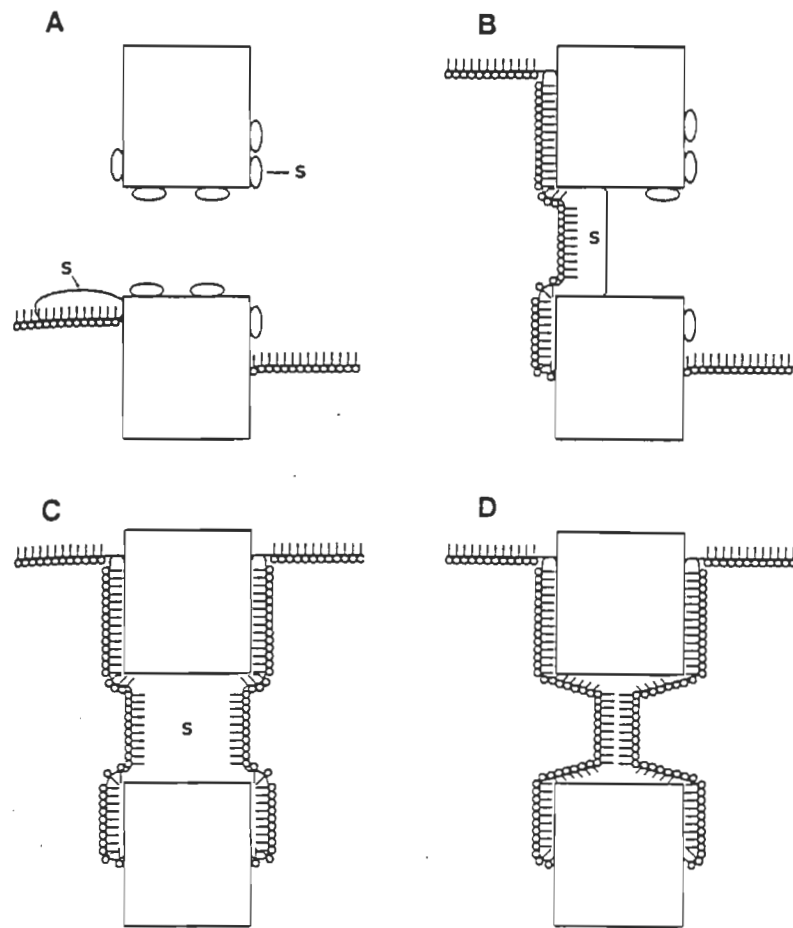


FIGURE 4 Illustration of the formation of membranes made by raising monolayers. (A) The monolayers are still below the hole, but the left-hand monolayer is being raised. The hydrocarbon coating the hole (e.g., squalene), denoted by the letter S, is swept along by the rising monolayer. (B) The left-hand monolayer has been raised above the hole. Squalene plugs the hole, and a phospholipid monolayer exists at the squalene-water interface. (C) Both monolayers have been raised above the hole. A thick membrane consisting of squalene with phospholipid monolayers at each squalene-water interface fills the hole. (D) The membrane has thinned, and a solvent-free bilayer with supporting torus fills the hole. In practice, the thinning process can occur while the second monolayer is being raised above the hole.

Figure 4.3. – Mode de formation d'une bicouche Montal-Mueller. Hypothèse de Niles & coll. (Tiré de Niles & coll., 1988).

Nous croyons que les observations de Niles & coll. ne sont pas généralisables. Elles résultent d'une géométrie particulière de leur montage (diamètre de l'orifice voisin de l'épaisseur du support, bassins de capacité inférieure au millilitre) et aussi d'une méthodologie qui leur est propre: "*In practice, sufficient squalene is added to ensure the configurations illustrated by fig 4,b and c occur*" (p.333). Si les auteurs ne rajoutent pas de squalène, peuvent-ils former des bicouches épaisses ?!! Quel volume de squalène rajoutent-ils ? Ce volume est-il déposé à l'aide d'une microseringue à l'interface ? Répétons: les bicouches planes formées par Niles & coll. peuvent-elles être rapprochées des bicouches Montal-Mueller "traditionnelles" ?

L'article de Niles & coll. (1988) montre bien à quel point le mode de formation des bicouches Montal-Mueller demeure méconnu. Il montre aussi que différents montages, différentes méthodologies peuvent conduire à des modes de formation différents. Peut-on comparer une bicouche formée en ajoutant des lipides sur les films à l'interface pendant la montée des niveaux d'eau (Schindler, 1989) à celle formée sans ces ajouts ? Peut-on comparer une bicouche formée à partir de films lipidiques auxquels du décane est ajouté (Tosteson & Tosteson, 1978) à une bicouche formée vraiment sans solvant ? Peut-on comparer une bicouche formée au premier essai à une autre formée après avoir élevé et abaissé les niveaux à plusieurs reprises ? Ces questions méritent d'être posées...

Résumé

Plusieurs conditions doivent être réunies pour qu'une bicouche Montal-Mueller se forme et soit stable. Certaines à l'échelle moléculaire, telle l'interdigitation des chaînes aliphatiques; d'autres à l'échelle macroscopique, telle l'absence de poussières sur le pourtour de l'orifice. Cela n'implique pas par contre que la bicouche se forme toujours de la même façon. Différentes conditions peuvent conduire la bicouche à adopter certains modes de formation de préférence à d'autres. Il est possible aussi que les conditions prévalant lors des différents stades de la formation de la bicouche, en particulier lorsque la lentille se détache de l'orifice, puissent influencer le devenir de la bicouche. La formation de la bicouche Montal-Mueller demeure, près de vingt ans après les débuts de la technique, un phénomène complexe et bien méconnu.

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.0 Introduction

L'on a beau planifier avec soin ses expériences, tester l'appareillage jusqu'à ses limites, noter le moindre détail, établir des protocoles stricts, il est difficile après quelques années de ne pas se retrouver avec un magma de données disparates et indigestes. Différentes causes peuvent y concourir: une interface technique qui évolue, des données imprévues, un projet que l'on bonifie, et ce qui s'est révélé particulièrement vrai dans le cas présent, des données difficiles à obtenir. Nous aurions aimé fabriquer une bicouche à chaque fois du premier coup, pouvoir enregistrer une courbe I-V pour chacune de ces bicouches, et ce, au même moment, et dans les mêmes conditions. La réalité fut tout autre. Les bicouches n'obéissent pas au doigt et à l'oeil, encore moins à la baguette.

Nous avons choisi de présenter les données dans l'ordre où nous les recueillons. Les prochaines sections traiteront donc des mesures de capacité des bicouches lipidiques pures, des mesures de conductance à faible tension et des caractéristiques I-V de ces mêmes bicouches, puis des mesures de conductance et des caractéristiques I-V des bicouches dopées à la nonactine. La deuxième partie du chapitre traitera de l'extraction des barrières de potentiel à partir de ces dernières courbes I-V.

5.1 Mesures de capacité de bicouches phospholipidiques pures

5.1.0 Généralités sur la mesure de capacité

Nous avons vu, aux chapitres III et IV, que la mesure de la capacité nous permettait de suivre l'évolution de la formation de la bicouche. Nous avons vu aussi que c'est par elle que nous pouvions affirmer avec une certaine assurance que nous avons bien dans l'orifice une structure bilipidique. En effet, si l'on mesure l'aire de la bicouche, à partir d'une photographie de la bicouche (White, 1970) ou par une autre technique, et que nous connaissons la permittivité relative du milieu hydrocarboné, laquelle peut être estimée, à 1% près, à partir de la permittivité relative d'une série de monoglycérides (Requena & Haydon, 1975), nous pouvons tirer directement de l'équation 3.3 l'épaisseur du milieu hydrocarboné. L'épaisseur calculée correspondant environ au double de la longueur d'une chaîne aliphatique moyenne, nous pouvons raisonnablement penser que nous sommes en présence d'une bicouche bilipidique plane.

La mesure de capacité n'est pas la seule à donner des indications sur l'épaisseur de la membrane. Les techniques de diffraction des rayons-X (Franks & Lieb, 1979) et de diffraction des neutrons (Worcester & Franks, 1976; Simon & McIntosh, 1986) permettent aussi de connaître l'épaisseur de la membrane, mais dans des conditions beaucoup moins douces. Les mesures de réflectance sont plus intéressantes à cet égard. Quelques articles traitent de la détermination d'épaisseurs de bicouches lipidiques du type BLM selon cette technique (Cherry & Chapman, 1969; Dilger & coll., 1982). Il importe de souligner ici que les mesures de réflectance et de capacité se complètent bien; les premières, étant proportionnelles au carré de l'épaisseur de la membrane - parties polaires comprises - alors que les secondes sont inversement proportionnelles à l'épaisseur du milieu hydrocarboné. De la différence des épaisseurs calculées par ces deux techniques, on peut estimer l'épaisseur de la région des têtes polaires. Mais la complémentarité ne s'arrête pas là. La bicouche lipidique plane est animée de différents mouvements d'ondulation (Bach & Miller, 1980) et, par conséquent, il serait plus juste de discuter en termes d'épaisseurs moyennes. Or, les mesures de capacité et de réflectance ayant une dépendance différente avec l'épaisseur, il devient donc possible de tirer des informations sur l'amplitude et la longueur d'onde des fluctuations dominantes de l'épaisseur de la bicouche (Hladky & Gruen, 1982). Avec un modèle approprié, il est possible en principe, à partir des seules

données de capacité, de mesurer ces fluctuations (Yakovleva & Pasechnik, 1983; Pyatnitskii & Akimov, 1986).

La détermination de l'épaisseur des bicouches, ou des membranes en général, revêt un caractère fondamental, on s'en doute. De nombreux travaux visent à déterminer le lien entre épaisseur de la membrane et fonctionnement des protéines transmembranaires. La plupart des études, qu'elles portent sur des peptides modèles incorporées dans des bicouches modèles (Elliott & coll., 1983; Huang, 1986), sur de véritables protéines incorporées dans des membranes modèles (Caffrey & Feigenson, 1981; Peschke & coll., 1987) ou encore *in vivo* (Hendry & coll., 1985), semblent démontrer qu'il existe une épaisseur optimale du milieu hydrocarboné. Si la membrane est trop épaisse ou trop mince (« mismatch of protein and lipid hydrophobic thickness »), des forces élastiques se créent entre les lipides et protéines et affectent du même coup le fonctionnement de ces dernières (Sackmann, 1983).

5.1.1 Mesures préliminaires de la capacité spécifique

Les premiers tests ont porté sur la mesure de capacité de bicouches formées à partir de films multilipidiques de densité surfacique différente. Nous déposions d'un côté, sur une phase aqueuse NaCl 100 mM tamponnée à pH 7,0 (tampon phosphate 1 mM), un mélange PE-PS (fraction molaire 9:1) et de l'autre côté, sur la même phase aqueuse, un film pur de PC (extraite elle aussi des segments externes des bâtonnets). La mesure de capacité de 29 bicouches formées à partir de lipides "étalés" à une aire moléculaire moyenne de $0,04 \text{ nm}^2$ (environ dix-sept fois la quantité nécessaire pour former un film monomoléculaire au collapse) fut trouvée égale à $734 \pm 66 \text{ nF}\cdot\text{cm}^{-2}$ ou 734 correspond à la moyenne de la distribution et 66 à l'écart-type ³². Le résultat sur 30 bicouches, formées à partir de films à $0,15 \text{ nm}^2$ (l'équivalent d'environ cinq films monomoléculaires au collapse), fut de $740 \pm 64 \text{ nF}\cdot\text{cm}^{-2}$. La mesure de capacité ne dépend donc pas de la quantité de lipides déposée en excès, en tout cas dans la gamme d'excès couverte.

Mentionnons que les bicouches furent plus faciles à former et furent plus stables à partir des films à $0,04 \text{ nm}^2$, qu'à partir de ceux à $0,15 \text{ nm}^2$. Cela est étonnant car la quantité de lipides

³² Bien que le centimètre ne soit pas une unité conforme au système international d'unités, nous avons cru bon de l'utiliser afin de faciliter au lecteur la comparaison des données de capacité (et de conductance) avec l'ensemble des données apparaissant dans la littérature.

déposés est vraiment considérable (pour se "fixer" les idées, cela représente environ 900 000 et 250 000 fois le nombre de lipides composant la bicouche). Des bicouches du type PE/PS furent formées à partir de films à 0,20, 0,25, 0,35 et 0,40 nm²/molécule. Au fur et à mesure que la quantité de lipides déposés diminue, les bicouches deviennent de moins en moins stables et, à des aires moléculaires supérieures à 0,40 nm², pratiquement impossibles à former. Cette dernière constatation peut être expliquée si l'on fait l'hypothèse - et selon Schindler (1989) il s'agit d'une certitude - qu'en élevant les niveaux d'eau, des lipides se collent sur les parois du bain en téflon. Ainsi pour un périmètre de bassin de 19 cm (ce qui correspond aux bassins illustrés à la figure 3.2), et en supposant que les phospholipides adhèrent aux parois à une aire moléculaire de 0,40 nm², il suffit d'élever le niveau d'eau après déposition de 5 mm (ce qui correspond à peu de chose près à la réalité) pour que l'aire moléculaire passe de 0,40 nm² à 0,55 nm²/molécule (ce qui correspond à une pression de surface de 35 mN•m⁻¹ environ. Or, Tancrède et coll. (1983) rapportent qu'il est impossible de former des bicouches à partir de films comprimés à moins de 45 mN•m⁻¹ (pression au collapse). Schindler (1989) va dans le même sens en affirmant que les bicouches Montal-Mueller ne peuvent être formées que si la pression, dans chacun des films, excède la pression d'étalement à l'équilibre du lipide (« equilibrium spreading pressure »). D'après Schindler, cette pression varie de 25 à 45 mN•m⁻¹ selon le lipide en question.

Pour des raisons de disponibilité des lipides, de facilité de formation et de stabilité des bicouches formées, nous sommes convenus d'une aire optimale de déposition de 0,15 nm²/molécule. Par la suite, toutes les bicouches furent formées à partir de films lipidiques purs étalés à cette aire optimale.

Nous avons ensuite vérifié si la capacité dépendait de la manière dont nous élevions les niveaux. Le test fut fait à partir de membranes PE/PS formées sur un support de téflon de 6 µm d'épaisseur (phase aqueuse: NaCl 100 mM, pH=7,0). Pour 38 bicouches formées du côté cis (PE), nous obtenons une valeur de 661 ± 51 nF•cm⁻²; valeur statistiquement équivalente à celle obtenue en élevant en dernier lieu le niveau trans (PS): 661 ± 47 nF•cm⁻² (17 membranes).

Ayant à notre disposition des rubans de téflon de différentes épaisseurs, nous avons vérifié si les bicouches formées sur ces différents rubans montraient les mêmes propriétés

électriques. À notre grande surprise, il s'est avéré que la capacité des bicouches formées dépendait de l'épaisseur du support.

5.1.2 Effet de l'épaisseur du support sur la capacité

L'étude fut effectuée sur des membranes PE/PS (lipides d'origine bovine) formées sur des supports de 6 à 25 μm d'épaisseur. La même solution saline (NaCl 100 mM + tampon phosphate 1 mM, pH = $7,0 \pm 0,2$) fut utilisée pour toutes les expériences. Les valeurs de capacité mesurées apparaissent au **tableau 3**. Nous y notons une capacité constante ($\approx 665 \text{ nF}\cdot\text{cm}^{-2}$) pour des bicouches formées sur des supports entre 6 et 13 μm d'épaisseur puis une augmentation de capacité d'environ 10% entre les bicouches formées sur des supports de 13 et 25 μm , respectivement. Cette augmentation de 665 à 725 $\text{nF}\cdot\text{cm}^{-2}$ peut paraître faible en regard d'un coefficient de variation d'environ 6%. Mais étant donné le grand nombre de bicouches formées sur chacun des supports, cette hausse de 10% de la valeur moyenne de capacité est vraiment significative (voir annexe 4, "p. 227").

Tableau 3

Capacité spécifique de membranes asymétriques PE/PS
formées sur des supports d'épaisseurs différentes

Epaisseur μm	Capacité spécifique $\text{nF}\cdot\text{cm}^{-2}$	N	δ_{HC} nm
6,4	661 ± 50	54	2,95
9,5	665 ± 25	38	2,93
12,7	663 ± 44	55	2,94
19,0	694 ± 42	49	2,81
25,4	724 ± 48	25	2,69

N: nombre de membranes formées, δ_{HC} : épaisseur de la région hydrocarbonée ($\epsilon_{\text{HC}} = 2,2$).

De nombreuses explications furent examinées afin de rationaliser cet effet. Les unes faisaient intervenir des variations de la conductivité de la zone de transition, d'autres, de la permittivité diélectrique de cette même région. D'autres encore reposaient sur un nombre variable de pores aqueux transitoires traversant la bicouche, ou encore sur un changement de l'aire occupée par la bicouche.

L'hypothèse que nous avons finalement retenue, et qui demeure encore la plus plausible, est celle dite des micelles inverses (chaînes aliphatiques orientées vers l'extérieur, parties polaires limitant un intérieur aqueux). Ces micelles, encore appelées systèmes micellaires du type hexagonal H_{II} , pourraient se trouver dans la zone ceinturant la partie bilipidique et affecter indirectement la constitution de la bicouche. Nous ne discuterons pas ici en détail de cette hypothèse (elle fait l'objet de l'article apparaissant à l'annexe 4).

Signalons simplement que si moins d'un millième de la quantité de phospholipides présents dans l'orifice se retrouve sous forme de micelles inverses dans la zone périphérique, nous pouvons calculer, à l'aide d'une expression se retrouvant dans Gruen & Wolfe (1982) et Israëlchvili (1985), une diminution de la tension latérale dans la bicouche d'au moins $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ lorsque le nombre moyen de lipides par micelle passe de 25 à 50 molécules. Ce calcul est effectué en considérant une aire moyenne par phospholipide de $0,70 \text{ nm}^2/\text{molécule}$ (Rand & Parsegian, 1989). Si l'on prend un module de compressibilité élastique de l'ordre de $150 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Kwok & Evans, 1981; White & King, 1985; Rand & Parsegian, 1989), une diminution de la tension latérale de $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ entraîne, toujours à $0,70 \text{ nm}^2/\text{molécule}$, une augmentation de l'aire moléculaire d'environ $0,005 \text{ nm}^2$. Cette augmentation, quoique faible, peut permettre aux molécules d'eau de s'avancer plus profondément à l'intérieur du milieu hydrophobe (hydratation plus importante de la région glycérol). Les capacités spécifiques en jeu correspondant à des épaisseurs hydrophobes de 2,93 et 2,69 nm (dernière colonne du tableau 3), un déplacement vers l'intérieur de l'interface diélectrique de 0,13 nm (l'équivalent en distance d'une moitié de molécule d'eau environ) de chaque côté suffit. Si la zone de transition de bicouches formées sur des supports de grande épaisseur contient, pour une raison ou une autre, des micelles de plus grandes dimensions (ou encore en plus grande concentration) que celles formées sur des supports plus minces, l'effet d'augmentation de capacité peut être rationalisé.

Rétrospectivement, cette hypothèse peut presque couler de source: i) la géométrie du support conditionne l'organisation de la zone périphérique, ii) l'organisation de la zone périphérique conditionne dans une certaine mesure l'organisation de la bicouche et iii) une petite variation (sur une base absolue) de l'épaisseur de la région hydrocarbonée peut entraîner un changement notable de la capacité (petit effet, grande cause). Une hypothèse

plausible, certes, mais une hypothèse sans plus: l'aire moléculaire moyenne des phospholipides d'une bicouche PE/PS varie-t-elle vraiment avec l'épaisseur du support ?

La question reste ouverte mais un fait demeure: la capacité de la bicouche semble dépendre de l'épaisseur du support. Il est donc nécessaire de spécifier pour chaque bicouche sur quel support elle a été formée. Afin d'éviter d'ajouter une variable supplémentaire, et puisque l'épaisseur du support est susceptible d'affecter également la conductance de la bicouche dopée, nous nous sommes limités par la suite à l'utilisation d'une seule épaisseur du support. Pour différentes raisons (facilité de perforation de l'orifice, rigidité du support, facilité de formation des bicouches), nous avons choisi une épaisseur de 19 μm .

5.1.3 Mesures de capacité de bicouches de différentes compositions

Des bicouches ont été formées à partir de films phospholipidiques de différentes compositions. La capacité spécifique des différents types de membranes varie-t-elle ? Une bicouche PS/PS possède-t-elle une région hydrocarbonée plus petite (ou une permittivité relative plus élevée) qu'une bicouche PE/PE ?

Au **tableau 4** apparaissent des mesures de capacité de bicouches phospholipidiques pures formées sur un support de téflon de 19 μm d'épaisseur. Elles furent prises pour la plupart à la quinzième minute et ne montraient alors qu'une faible variation dans le temps (inférieure à 0,2% par minute). Première constatation: les mesures de capacité de bicouches formées à partir de lipides synthétiques ne se distinguent pas de celles de bicouches formées à partir de lipides natifs. Rien de bien surprenant puisque l'analyse des chaînes par chromatographie en phase gazeuse a démontré que tous les lipides naturels possèdent en moyenne des chaînes de 18 atomes de carbone (même épaisseur moyenne donc). Deuxième constatation: la nature de la tête polaire n'influence pas significativement la mesure de capacité. Cela était également attendu puisque les régions polaires contribuent faiblement à la mesure de capacité.

Tableau 4
Mesures de capacité de bicouches phospholipidiques pures

Lipides	Phase aqueuse mM	C_s nF/cm ²	N
<i>SYNTHÉTIQUES</i>			
DOPC/PC-ÉTHER	KCl 100	799 ± 84	10
DOPE/DOPE	KCl 10	764 ± 77	5
DOPE/DOPE	KCl 100	693 ± 48	20
DOPE/DOPG	KCl 100	675 ± 55	14
DOPE/DOPS	KCl 100	686 ± 62	29
<i>NATURELS</i>			
PE/PE	KCl 100	709 ± 54	12
PE/PS	NaCl 100+P1	694 ± 42	49
PS-H/PS-H	KCl 100	690 ± 75	6

C_s : capacité spécifique moyenne ± écart-type; N: nombre de bicouches; P: tampon phosphate.

Les données de capacité obtenues se comparent tout à fait à celles apparaissant dans la littérature. Le tableau 2 de l'annexe 4 en fait foi. Si on calcule maintenant l'épaisseur hydrocarbonée à l'aide de la relation 3.3, nous obtenons, en prenant une permittivité relative de 2.2 (celle de l'acide oléique), des valeurs allant de 2,5 à 2,9 nm. Des mesures par diffraction aux rayons-X arrivent sensiblement au même résultat: 2,7 nm (DOPC, Lewis & Engleman, 1983), 2,8 nm (DOPC, King & White, 1986), 2,8 nm (PC extraite de jaune d'oeuf, Scherer, 1989); pour ne citer que ceux-là. Les auteurs cités définissent dans tous les cas la zone hydrocarbonée comme étant celle limitée par les premiers carbones des chaînes. Si l'état physique des deux types de bicouches (films Montal-Mueller et films multibilipidiques) est comparable, la frontière diélectrique serait située dans la région acétyle des phospholipides.

5.1.4 Variabilité des mesures de capacité

Les valeurs de capacité apparaissant au tableau 4 n'ont peut-être pas de quoi étonner mais l'écart-type sur ces mesures, si. En effet, comment expliquer ces coefficients de variation de l'ordre de 8% (lipides extraits) ? Comment expliquer que nous mesurons, dans le cas de

bicouches formées à partir de lipides synthétiques possédant tous une chaîne oléoyle (une région hydrocarbonée identique?), les mêmes variations de capacité spécifique ?

En ce qui concerne les bicouches comportant au moins une interface chargée, nous pourrions toujours invoquer que le potentiel de Gouy à la surface n'est pas toujours le même et que, par conséquent la capacité associée à la double couche électrique varie d'une bicouche à l'autre, affectant ainsi la capacité mesurée. Deux raisons nous obligent à rejeter cette idée: i) le fait que nous retrouvons la même variabilité sur des bicouches constituées de lipides zwitterioniques et ii) la capacité associée aux couches diffuses ne peut compter pour plus de 8% (compte tenu de nos conditions expérimentales) de la capacité totale mesurée. Or, il faut bien se rendre compte que l'étendue des mesures est de l'ordre de six fois la valeur de l'écart-type, soit environ 50% en valeur relative. Rappelons que l'incertitude liée à la mesure de la capacité spécifique proprement dite demeure inférieure à 5%, soit dix fois moins. La question se pose: qu'est-ce qui distingue autant une bicouche DOPE/DOPE d'une autre bicouche DOPE/DOPE ?

Peu d'auteurs se sont penchés sur cette variabilité des mesures de capacité. En fait seuls Niles & coll. (1988) ont effleuré la question. Selon eux, la variabilité des mesures de capacité serait due à la nature intrinsèque des bicouches. (Cela n'est guère éclairant...). Plus précisément, nous croyons que la zone de transition est encore ici en cause. Comme nous l'affirmions dans l'article précité (Brullemans & Tancrède, 1987), la variabilité des mesures de capacité serait causée par une variabilité de la composition de la zone ceinturant la bicouche, et ce, selon le schème décrit à la section 5.1.2. Compte tenu du mode de formation particulier de la bicouche Montal-Mueller, cette hypothèse ne saurait être rejetée. En effet, rien ne nous garantit que la microtopographie de l'orifice perforé n'affecte pas la composition de la zone de transition, rien ne nous garantit non plus que la quantité d'enduit appliqué (et sa position sur le pourtour de l'orifice) n'influence pas la composition et l'organisation de cette même zone. Et surtout, rien ne nous permet d'affirmer que la manière dont les niveaux d'eau sont élevés n'affecte pas, ne serait-ce que via la zone de transition, la bicouche formée. Tout au contraire, il est probable que les conditions prévalant lors de la formation d'une bicouche DOPE/DOPE diffèrent de celles prévalant lors de la formation d'une autre bicouche DOPE/DOPE.

Trois observations appuient nos dires. La première est à l'effet que pour un même nombre de membranes (de l'ordre de 15), le coefficient de variation est environ deux fois plus petit si ces membranes sont formées la même journée, sur un même support, que si nous les formons durant cinq jours d'affilée, sur cinq supports différents de même épaisseur. La seconde concerne l'effet de l'application de squalène. Il nous est apparu que l'application de squalène entre la fabrication de deux membranes entraîne un plus grand écart entre les deux mesures de capacité que si les deux membranes sont formées, l'une après l'autre, sans rajout de squalène. Enfin le fait que si nous élevons et rabaissons, pendant une séance de travail donnée, le même niveau d'eau, les valeurs de capacité sont davantage rapprochées que si, pour une raison ou l'autre, nous procédions de manière plus "anarchique".

Soulignons que l'hypothèse des micelles inverses que nous avons avancée trouve son parallèle du côté des films noirs. Dilger & coll. (1982) expliquent ainsi les différences de capacité de bicouches de DOPC (note p. 173):

" The origin of the variability in the phospholipids is probably the presence of water in the decane solutions. The use of specially dried solvents during the preparation of these solutions has been shown to eliminate the difficulty (J. Requena, Ph.D. Dissertation, 1974) "

Mentionnons en terminant que sur les 1161 bicouches que nous avons préparées au cours de notre travail, et dont le temps de vie a excédé cinq minutes, nous avons pu mesurer la capacité de 820 d'entre elles (soit environ 70%).

5.2 Mesures de conductance de bicouches phospholipidiques pures

5.2.0 Généralités

La conductance d'une bicouche pure est un phénomène beaucoup plus difficile à cerner que sa capacité. Cela tient au fait que la bicouche lipidique constitue un excellent isolant électrique. Or, s'il est relativement facile de mesurer la permittivité d'un milieu isolant, il en est tout autrement de sa résistivité. Dans le cas d'excellents isolants, les courants à mesurer sont extrêmement faibles (et pour des tensions de l'ordre du mV, pratiquement non mesurables). Non seulement les mesures de conductivité des isolants sont-elles difficiles,

elles sont aussi irreproductibles. Il n'est donc pas étonnant que les phénomènes de conduction dans les isolants soient si mal connus.

En ce qui concerne plus spécifiquement les phénomènes de conduction dans les diélectriques liquides, nous ne pouvons passer sous silence la monographie d'Ignace Adamczewski (1968). L'auteur y mentionne que les alcanes, avec une résistivité de l'ordre de $10^{20} \Omega \cdot \text{cm}$, constituent les meilleurs des diélectriques liquides. Cette valeur extrêmement élevée n'est toutefois atteinte qu'après un certain temps, une heure environ, et à la condition que la substance soit exempte de tout contaminant. Si nous prenons une valeur de résistivité comprise entre $10^{15} \Omega \cdot \text{cm}$ et $10^{20} \Omega \cdot \text{cm}$, nous pouvons nous attendre à des mesures de conductance spécifique de nos bicouches lipidiques entre 0,000 3 et 3 $\text{nS} \cdot \text{cm}^{-2}$. Il n'est pas dit cependant que l'on puisse comparer la conductivité d'un volume macroscopique d'acide oléique à la conductivité d'une bicouche de DOPE, surtout que la bicouche et le tore périphérique ne constituent pas un système pur; nous y retrouvons, à tout le moins, lipides, squalène et eau.

5.2.1 Mesures de conductance de bicouches de différentes compositions

Après avoir mesuré la capacité de la bicouche venant d'être formée, nous mesurons le courant membranaire à faible tension. Nous choisissons en général une tension comprise entre +20 et +50 mV. Pour des tensions plus faibles, le rapport signal sur bruit devient trop faible alors que, pour des tensions plus élevées, la résistance de la bicouche devient non ohmique (voir prochaine section). À la **figure 5.1** apparaît l'enregistrement du courant traversant une bicouche phospholipidique asymétrique. Il s'agit plus précisément d'une photocopie du tracé original d'une bicouche DOPE/DOPS formée le 6 novembre 1988. Cette membrane fut formée au premier essai environ 45 minutes après la déposition des films. Le courant mesuré, à +40 mV, est en moyenne de 0,3 pA. Le diamètre de la membrane étant de 260 μm , cela correspond à une conductance spécifique d'environ 14 $\text{nS} \cdot \text{cm}^{-2}$. Nous notons également que l'agitation des bassins ne modifie pas la conductance spécifique de cette membrane.

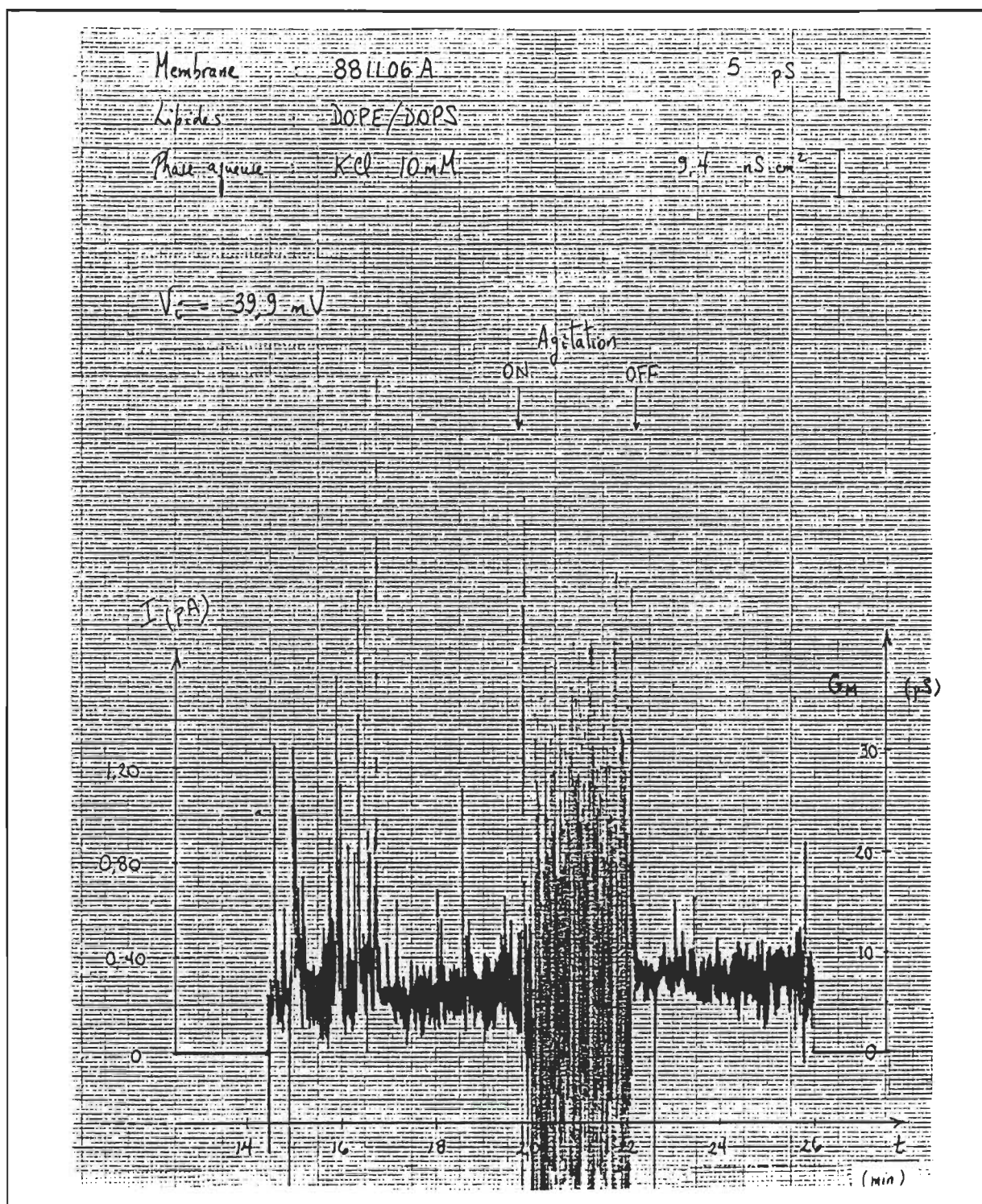


Figure 5.1. – Enregistrement en fonction du temps du courant traversant une bicouche phospholipidique asymétrique. La bicouche fut formée au premier essai. Le bruit apparaissant au début de l'enregistrement est causé par la présence de l'expérimentateur.

Sur les 1161 bicouches répertoriées, nous n'avons pu prendre la mesure de conductance que sur 370 environ, soit un peu plus de 30%. Cela s'explique en partie par le fait qu'un certain nombre de bicouches se sont naturellement brisées avant la barre des quinze minutes mais aussi parce qu'un nombre beaucoup plus important de bicouches nous ont quitté lors du passage obligé du circuit de capacité au circuit courant-tension. Nous retrouvons, au **tableau 5**, les mesures de conductance d'une série de bicouches de différentes composition. Nous n'avons conservé que les seules bicouches pour lesquelles nous étions certains qu'elles ne puissent être contaminées par la présence antérieure de nonactine dans les bassins.

Tableau 5
Mesures de conductance de bicouches lipidiques pures

LIPIDES	Phase aqueuse mM	G_s $nS \cdot cm^{-2}$	N ...	Étendue de G_s $nS \cdot cm^{-2}$
Zwitterioniques				
DOPC / DOPC	KCl10+LiCl90	35	2	30-40
DOPC / PC-ETHER	KCl10+LiCl90	100	2	90-110
DOPE / DOPE	KCl10	5	1	...
DOPE / DOPE	KCl100 ou KCl10+Li90	20	15	5-60
Zwitterioniques // Chargés				
DOPE // DOPG	KCl10+LiCl90	20	16	5-50
DOPE // DOPS	KCl10	15	1	...
DOPE // DOPS	KCl10+LiCl90	20	10	5-70
DOPE // DOPS	KCl100	25	8	10-60
DOPE // PS	KCl100	30	5	10-70
PE // PS	KCl100	300	15	40-600
PE // PS	KCl100+P1	130	3	110-150
PE // PS *	NaCl100+P1	110	11	50-200
PE // PS	NaCl100+P1	100	6	75-150
PE / PS-H *	NaCl100+P1	130	5	100-180
Chargés				
DOPG / DOPG	KCl100	510	2	490-530
PS-H / PS-H	KCl10+LiCl90	850	7	400-1100

Toutes les bicouches furent fabriquées sur un support de 19 μm sauf celles marquées d'un astérisque. Le symbole X/Y signifie quant à lui que nous avons regroupé les données sur des bicouches asymétriques X/Y et Y/X. G_s : conductance spécifique; N : nombre de bicouches.

Il est difficile, étant donné le petit nombre de mesures et l'étendue des valeurs, de discriminer entre les valeurs de conductance des différents systèmes étudiés. Il semble ressortir, mais cela demeure à être confirmé, 1) que les bicouches formées de lipides synthétiques ont une conductance plus faible que leurs analogues naturels (influence de l'hétérogénéité des chaînes aliphatiques) et 2) que les bicouches chargées négativement des deux côtés sont d'un ordre de grandeur plus conductrices que leurs équivalents zwitterioniques (influence de la charge nette de la tête polaire).

Si véritablement, l'hétérogénéité des chaînes et la charge nette du lipide influencent la mesure de conductance, il faudrait prendre garde à établir des critères de rejet trop stricts. En effet, il est commun dans les études en bicouches planes que les auteurs rejettent toute bicouche dont la conductance excéderait une certaine valeur. (Une bicouche trop conductrice serait, selon l'avis général, un signe de contamination de la bicouche par une substance mystérieuse (!) appelée « artifact-inducing »). Pour la plupart ce seuil se situe à $10 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Alvarez & Latorre, 1978; Schindler, 1989; Cukierman & coll., 1988). Pourtant il nous arrive de lire (Slatin, 1988):

"The aperture (which is generally pretreated with squalene) then supports a nearly hydrocarbon-free lipid bilayer which (with luck) will have very low electrical resistance ($\approx 10 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-2}$) and reasonable stability."

et encore (Perin & MacDonald, 1989):

"Acceptable squalene-based BLMs were 3×10^6 to $3 \times 10^7 \Omega\cdot\text{cm}^2$."

en résumé (Fornés & Procopio, 1987):

"The unmodified membrane conductance was quite variable as is the rule with lipid bilayer preparations, but membranes with conductances higher than $10^{-8} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}$ were discarded."

Cette manière de procéder nous apparaît discutable. Pourquoi une bicouche ayant une conductance de $30 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-2}$ serait-elle frappée d'interdit ? Dans une très belle étude utilisant des monoglycérides de différentes longueurs de chaîne, Vodyanoy & Hall (1984) démontraient que le logarithme de G_s est proportionnel à l'épaisseur δ_{HC} de la bicouche Montal-Mueller. La variation de G_s est plutôt rapide passant de 20 (MG 14:1) à

30 000 nS·cm⁻² (MG 22:1). Cette étude démontre que la conductance dépend de la composition de la bicouche. L'application aveugle d'un critère de rejet aussi strict que celui avancé dans la littérature nous semble, par conséquent, non fondée.

5.2.2 Mécanisme de la conduction au travers d'une bicouche lipidique

Les faibles conductances observées laissent à penser que le milieu hydrocarboné ne contient qu'un petit nombre de porteurs de charge. Bien, mais quelle est la nature de ces porteurs de charge ? S'agit-il d'électrons ou de trous (conduction électronique) ? S'agit-il de polarons³³ (conduction polaronique) ? S'agit-il de cations ou d'anions présents dans la phase aqueuse (conduction ionique) ? Nous n'en savons encore rien. Selon les expérimentalistes Vodyanoy & Hall, la conductivité des bicouches lipidiques pures serait assurée par les cations. Les théoriciens se penchent quant à eux sur des modèles de conduction polaronique. Les valeurs de conductivité prédites par leurs modèles sont de quelques ordres de grandeur plus faibles que celles observées mais un accord demeure possible pour des polarons de petites dimensions (Pastushenko, 1984).

5.2.3 Observations de sauts de conductance

Même en affinant les théories, certains phénomènes reliés à la conductance membranaire demeureront difficiles d'approche. Nous faisons référence ici à l'existence de sauts de conductance. Cela peut paraître étonnant mais des bicouches formées de lipides seulement montrent des sauts de conductance. Nous avons observé de tels sauts sur des bicouches DOPE/DOPS (voir **figure 5.2**). L'amplitude des échelons de courant observés est de 10 pA environ (correspondant à des sauts de conductance de 200 pS) et la durée d'ouverture, de l'ordre de la minute. Antonov & coll. (1980) furent les premiers à rapporter des sauts de conductance de bicouches non dopées. Il s'agissait dans leur cas de films noirs de DSPC à la température de transition de phase du lipide. La température de transition de la DOPE et de la DOPS étant de -10°C, les bicouches DOPE/DOPS formées ne sont pas sujettes à une instabilité due à la présence de microdomaines. Il faut résolument se tourner ailleurs.

³³ Les polarons se créent suite à l'interaction forte entre un électron (ou un trou) et la région du matériau l'environnant. Sous l'action d'un champ électrique, le polaron entier (dont la masse effective est de milliers de fois celle de l'électron) se déplace et la conductivité polaronique apparaît (Pavlov & Kholkov, 1989, p.296).

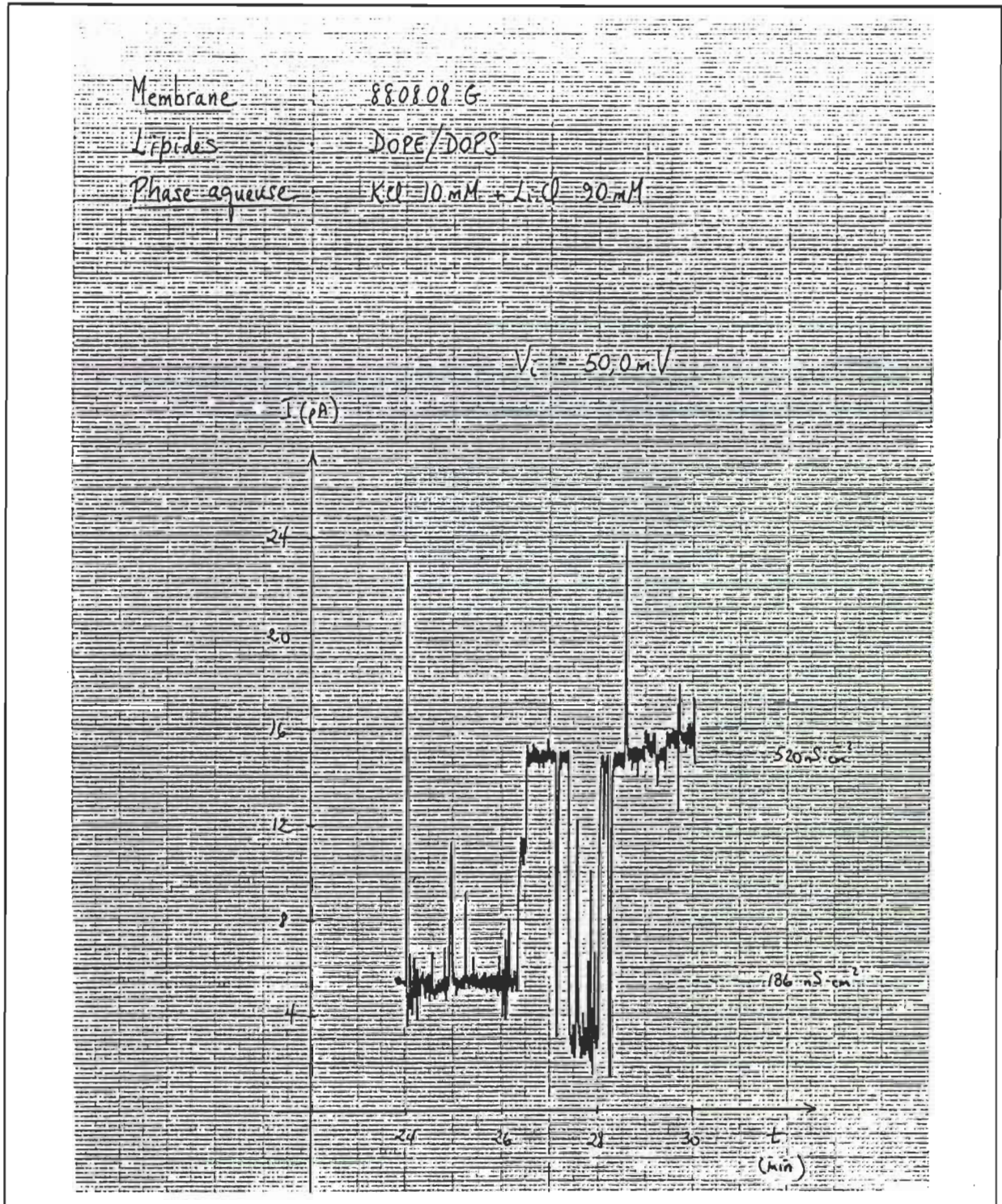


Figure 5.2. – Enregistrement en fonction du temps de la conductance à faible tension d'une bicouche phospholipidique asymétrique. Observation de sauts de conductance d'une amplitude voisine de $350 \text{ nS} \cdot \text{cm}^2$. La tension appliquée ($+50,0 \text{ mV}$) est environ six fois plus faible que la tension de claquage d'une bicouche de ce type.

Kaufmann & Silman (1983) ont observé l'apparition de sauts de conductance lors de la création d'un gradient de pH entre les deux phases aqueuses bordant une bicouche Montal-Mueller formée d'asolectine. Bien que nous ayons nous aussi un gradient de pH entre les deux interfaces (l'une étant chargée, l'autre pas), l'allure des sauts de conductance ne correspond pas (la durée d'ouverture de leurs "canaux" étant de l'ordre de 10 ms).

Yoshikawa & coll. (1988) observèrent des sauts de courant de l'ordre de la minute au travers de films multibilipidiques plans de DOPC formés sur des supports de type Millipore. Selon les auteurs, ces phénomènes, proches de l'auto-oscillation, ne seraient possibles qu'en présence de lipides contenant une insaturation. Nous avons ici une piste intéressante mais malheureusement les études portant sur des bicouches planes conventionnelles sont muettes à cet égard.

5.3 Courbes I-V de bicouches phospholipidiques pures

Le temps de vie des bicouches planes, qu'elles soient du type Montal-Mueller ou Mueller-Rudin («BLM»), dépend étroitement du "traitement" qu'elles subissent. Si l'on examine la seule imposition d'une tension électrique, les expériences démontrent que la valeur de la tension et la durée de l'imposition déterminent, pour une bonne part, l'espérance de vie de la bicouche. Schindler (1989) estime le temps de vie d'une bicouche Montal-Mueller autour de quinze minutes sous une tension de 150 mV mais seulement d'une minute à 250 mV. Ces chiffres ne sont donnés qu'à titre indicatif et représentent le temps de vie *moyen* d'une bicouche typique dans des conditions standards. (Il est question de probabilités ici et non de prédictions).

L'enregistrement d'une courbe I-V d'une bicouche Montal-Mueller ne constitue donc pas une mesure de routine. Le "dialogue" tient ici à un fil bien mince. Une centaine de bicouches seulement parmi toutes celles préparées ont supporté "l'interrogatoire". Cela s'explique par la rudesse du dialogue mais aussi parce que ces mesures s'effectuent généralement entre la 30^e et la 45^e minute et qu'une proportion encore plus grande de bicouches montre alors des signes certains de "lassitude".

Nous retrouvons, à la **figure 5.3**, un tracé typique d'une courbe I-V d'une bicouche PE/PE. La courbe I-V ressemble à celle obtenue à l'aide de l'analogie électrique membranaire (voir figure 3.10). À partir de la pente de la courbe donnée à la figure 5.3, nous pouvons calculer la résistance de la membrane. Nous obtenons une valeur de $120 \text{ G}\Omega$, peu importe la branche de la courbe³⁴. Cette valeur de résistance correspond à une conductance spécifique de la bicouche de $16 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-2}$. Connaissant la variation dV/dt , nous pouvons calculer, à partir de l'écart entre les deux courants à une tension donnée, la capacité dynamique à cette même tension. Nous obtenons une valeur de 450 pF à 0 mV . Si nous soustrayons la valeur de capacité lorsque nous abaissons un des niveaux, nous obtenons une capacité spécifique de la bicouche de $730 \text{ nF}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ce qui est intéressant des mesures courant-tension, c'est que nous pouvons connaître la conductance et la capacité dynamique sur toute la gamme des tensions balayées. Un coup d'oeil sur la figure 5.3 nous montre que la conductance et la capacité ne varient pas entre -100 mV et $+100 \text{ mV}$. D'autres courbes I-V prises quelques minutes plus tard mais entre -190 mV et $+190 \text{ mV}$ montrent un même comportement (capacité et conductance constantes et égales à $730 \text{ nF}\cdot\text{cm}^{-2}$ et $16 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-2}$ respectivement). Ce comportement bien que typique des bicouches DOPE/DOPE n'est pas généralisable. Un quart environ des bicouches DOPE/DOPE montre des caractéristiques courant-tension superlinéaires à partir de 100 mV . La courbe I-V demeure toutefois symétrique (capacité dynamique constante).

Le tracé de la figure 5.3 fut enregistré en branchant les entrées de l'enregistreur X-Y à l'entrée de l'étage d'amplification. À la **figure 5.4**, apparaît la même courbe après amplification, acquisition à l'ordinateur, et envoi à la table traçante. Eu égard à la différence entre les stylos marqueurs, et entre les deux types de papier, nous pouvons affirmer que les deux courbes sont identiques. Des dizaines d'autres courbes furent comparées sans que nous puissions différencier celles traitées et celles originales. Nous avons ainsi l'assurance que les étapes d'amplification, de conversion analogique-digital, de moyennage, de transformation des tensions mesurées en données exécutables pour la table traçante (programmes AQIV, IDEV et TRACN) n'affectent en rien l'information provenant du système. Ceci est important puisque l'extraction de la barrière de potentiel se fera soit à partir des données traitées, soit, si l'acquisition n'a pas eu lieu, à partir de l'enregistrement brut.

³⁴ Pour un cycle I-V complet, nous avons deux branches. La branche du haut est la branche des tensions ascendantes ($dV/dt > 0$) alors que la branche du bas est celle des tensions descendantes ($dV/dt < 0$). Le cycle I-V se parcourt donc toujours dans le sens des aiguilles d'une montre.

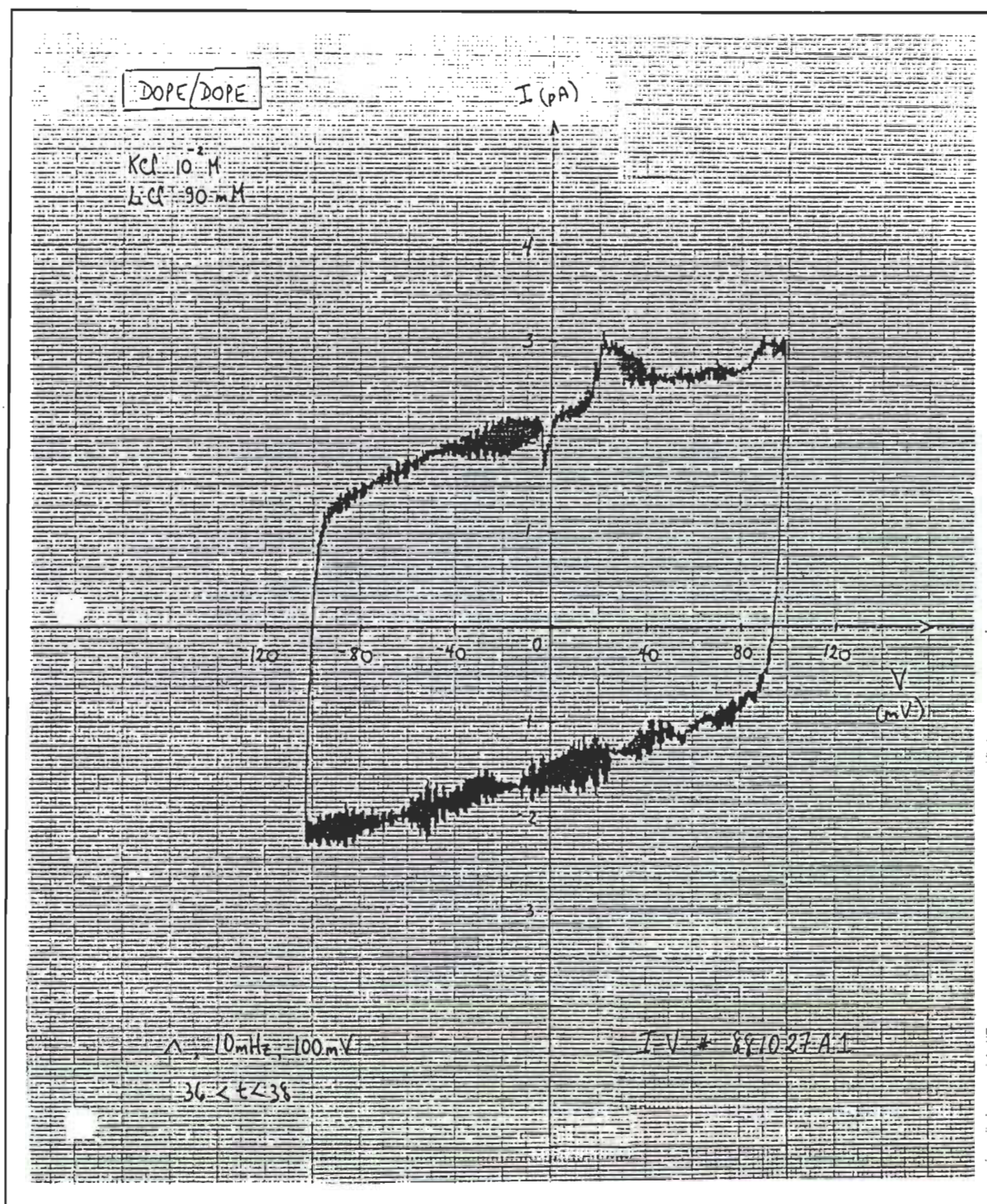


Figure 5.3. – Courbe I-V d'une bicouche phospholipidique symétrique (tracé original). La conductance dynamique est de l'ordre de 8 pS. Onde triangulaire de 100 mV d'amplitude et de fréquence égale à 10 mHz. Enregistrement pris entre la 36^e et la 38^e minute. Le diamètre de l'orifice est de 260 μ m.

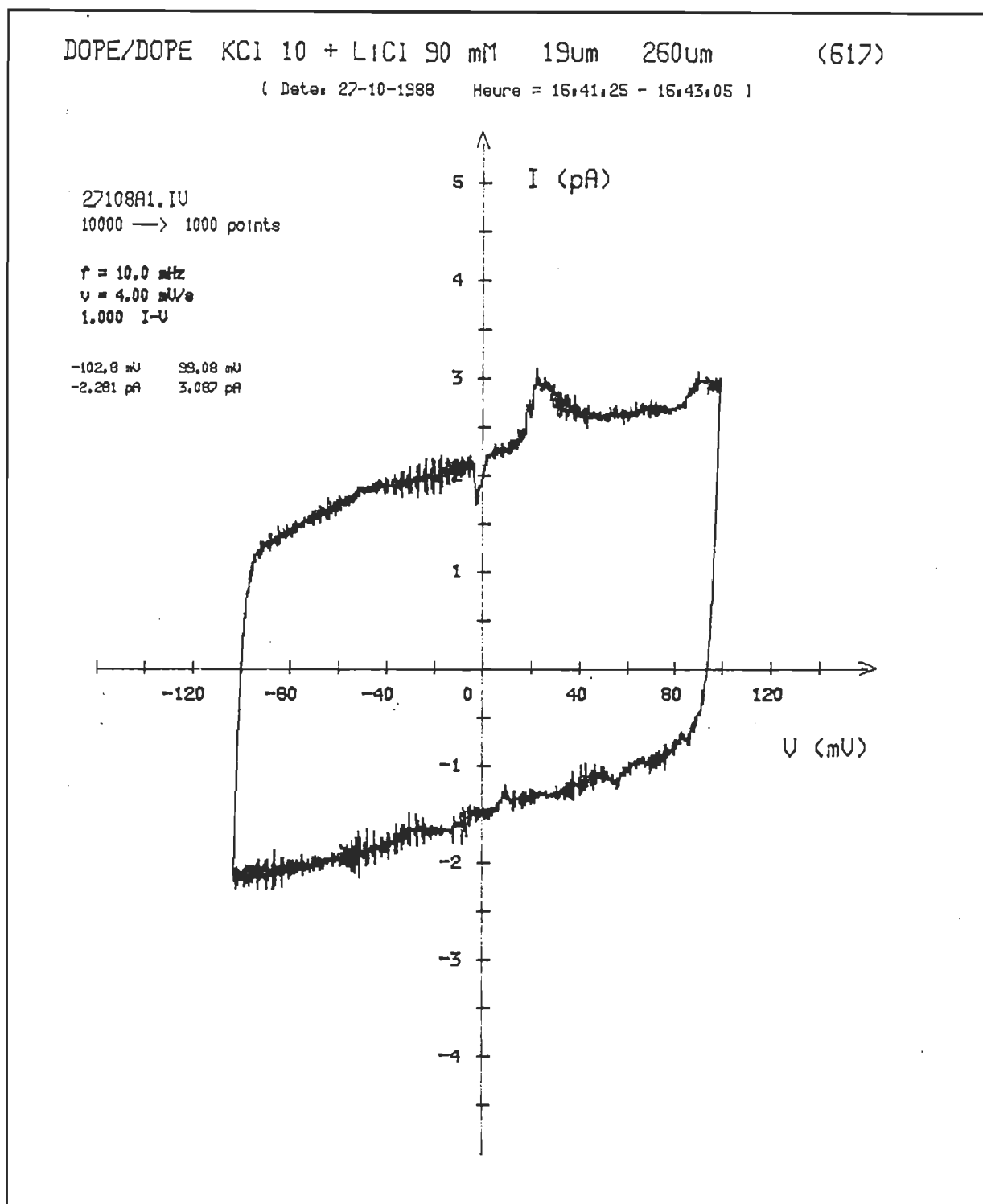


Figure 5.4. – Courbe I-V d'une bicouche phospholipidique symétrique (traitement à l'ordinateur). Tel qu'indiqué en haut à gauche, 10 000 points ont été acquisitionnés puis moyennés par groupe de 10. Les 1000 points restants ont été traités par le programme IDEV puis acheminés à la table traçante via le programme TRACN. À noter l'exacte similarité avec la courbe non-traitée (figure 5.3).

Les enregistrements de courbes I-V de bicouches pures de faible conductance sont excessivement rares. Le seul enregistrement que nous ayons relevé dans la littérature provient d'un article paru en 1985 dans un périodique de langue allemande bien connu: l'*Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. Les auteurs Ziegler & Pavlovkin présentent une courbe I-V d'un film noir formé d'asolectine. La courbe entre -80 mV et +80 mV n'a rien de particulier (capacité et conductance constantes et égales à $680 \text{ nF}\cdot\text{cm}^{-2}$ et $15 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivement). En ce qui concerne des bicouches Montal-Mueller, aucune courbe ne fut publiée à ce jour.

La courbe présentée à la figure 5.3 est donc inédite sans qu'elle ne soit marquée toutefois d'un caractère exceptionnel. Il en est autrement des figures 5.5 et 5.6 où nous présentons des courbes I-V de bicouches phospholipidiques asymétriques. À la **figure 5.5**, nous présentons la courbe I-V d'une bicouche DOPG/DOPE formée après plusieurs essais infructueux. La courbe I-V montre une asymétrie, une asymétrie positive ! Selon la convention établie antérieurement, cela signifie que pour une même valeur absolue de tension, le courant est plus fort lorsqu'il circule du compartiment cis vers le compartiment trans (DOPG --> DOPE) que dans le sens inverse (DOPE --> DOPG). Sachant qu'au pH de la solution, la DOPG est chargée négativement alors que la DOPE est neutre, cette courbe semblerait démontrer que les porteurs de charges sont des cations. De manière simpliste, disons que ceux-ci se trouvant en excès du côté DOPG, le gradient de concentration favorise leur transport vers le côté opposé, alors que ce même gradient rend défavorable le mouvement inverse. (Pour une explication plus rigoureuse, voir la section 2.3.3).

Si nous soustrayons pour chacune des branches le courant capacitif, nous calculons pour la branche supérieure un rapport de rectification à 120 mV de 2,2 et un rapport de 1,8 pour la branche descendante. Cet écart est directement relié au fait que le courant capacitif diminue pour des tensions excédant 80 mV. D'un point de vue formel, cette diminution du courant capacitif reflète une diminution de la capacité dynamique. Pourtant la mesure de capacité mesurée à l'aide du pont d'impédance ne varie pas avec la tension... Pourtant la capacité dynamique de bicouches phospholipidiques du type DOPE/DOPE et DOPC/DOPC ne varie pas avec la tension, même à 200 mV. Le phénomène serait-il relié à la présence d'une interface chargée ?

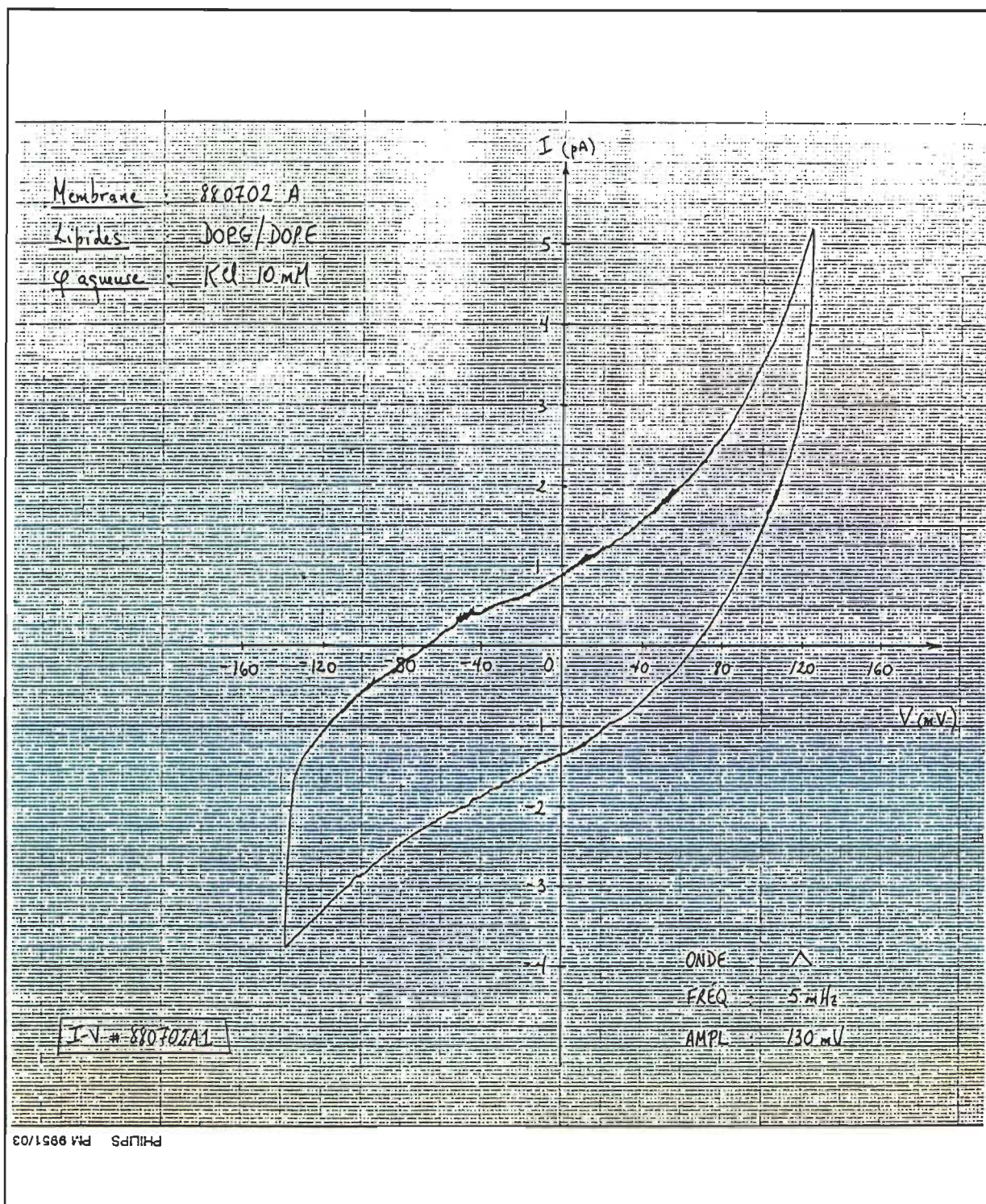


Figure 5.5. – Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique montrant une asymétrie positive ($R > 1$). La composition de la bicouche et de la phase aqueuse apparaissent en haut, à gauche. Les caractéristiques de l'onde de tension appliquée se retrouvent dans le coin inférieur droit. Le diamètre de l'orifice est de 270 μm .

Voyons ce qui se passe pour une bicouche dont l'asymétrie de charge est inversée. À la **figure 5.6**, nous présentons une courbe I-V d'une bicouche DOPE/DOPG formée le 8 août 1988. La bicouche est formée au deuxième essai. Elle constitue la première bicouche de la journée (d'où la lettre A) et la courbe I-V présentée est la première (d'où le numéro 1) et la seule enregistrée. Affriolante constatation: la bicouche montre une asymétrie négative ! À peu de chose près, elle constitue l'image-miroir de la précédente: rapports de rectification de 0,4 et 0,5 sur les branches ascendante et descendante, diminution de la capacité dynamique pour des tensions inférieures à -80 mV, conductance dynamique près de l'origine égale à $20 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-2}$ environ.

Évidemment, nous ne pouvons présenter ici toutes les courbes I-V de bicouches lipidiques enregistrées. Mais nous tenons à rassurer le lecteur; toutes les courbes I-V de bicouches du type lipide neutre/lipide négatif possèdent un rapport de rectification inférieur à 1 et toutes les courbes I-V montrant une asymétrie positive le furent sur des bicouches du type lipide négatif/lipide neutre. Il semble bien, quoique l'ion chlorure (le co-ion) ait un rayon plus gros que les cations Li^+ , Na^+ et K^+ (et partant, une barrière d'énergie de Born plus faible donc) que le transport soit vraiment assuré par des cations. Ces résultats inédits appuient donc l'hypothèse de Vodyanoy & Hall (1984).

Le sens de l'asymétrie des courbes I-V semble déterminé par le signe de $\Delta\psi_{\text{DC}}$, mais sa grandeur demeure très variable et aléatoire. Le paramètre d'asymétrie A à 120 mV prend typiquement des valeurs de 2, mais il n'est pas rare qu'il tende vers 1, sans raison apparente. Il arrive encore qu'il prenne une valeur aussi élevée que 10 ou 15. Ces variations pourraient peut-être s'expliquer si nous avons un modèle de transport pour des bicouches lipidiques pures. Les tentatives en ce sens sont aussi rares que les données expérimentales. Signalons quand même le travail d'une équipe tchèque (Brynda & coll., 1985) portant sur la modélisation de la superlinéarité des courbes I-V de films noirs de cholestérol oxydé. Leur approche repose sur la théorie des pores aqueux transitoires (voir travaux de Weaver & coll., 1984 et de Powell & Weaver, 1986) appliquée au claquage diélectrique (Glaser & coll., 1988). Selon Brynda & coll., la superlinéarité de la courbe I-V serait expliquée par la formation de pores de plus grands rayons lors de l'augmentation de la tension. Hormis le fait qu'elle ne fournit que la forme de la courbe I-V, la théorie semble encore mal se prêter à l'étude de courbes asymétriques.

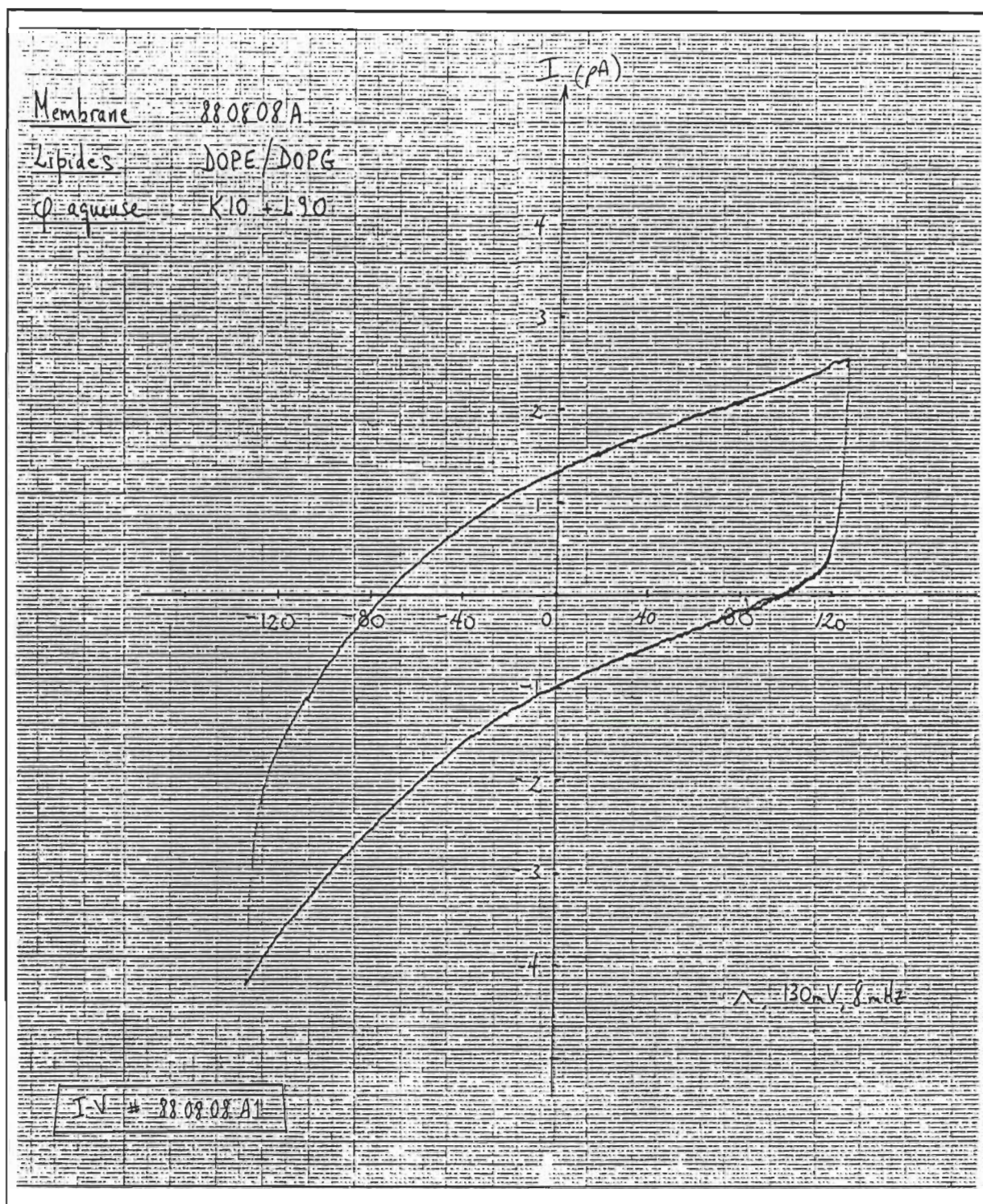


Figure 5.6. – Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique montrant une asymétrie négative ($R < 1$). Diamètre de l'orifice: 270 μm . À noter l'excellent rapport signal/bruit.

Etant donné la variabilité des courbes courant-tension des bicouches phospholipidiques asymétriques (sans compter les difficultés de les obtenir), vu également l'absence d'une théorie satisfaisante de la conductivité membranaire, nous n'avons pas poussé l'investigation plus avant. Plutôt que de s'échiner sur de petits courants capricieux, dopons, tel que convenu, nos bicouches de notre indicateur de potentiel. Dopons-les de nonactine; qu'elles parlent clair et haut !

5.4 Conductance à faible tension de bicouches phospholipidiques dopées à la nonactine

Les premiers essais d'incorporation de la nonactine dans des bicouches phospholipidiques eurent lieu à l'été 1985. Nous procédions alors en déposant à l'interface un mélange nonactine-phospholipides et en formant la bicouche à partir de l'adjonction de ces films. Cette façon de procéder était courante au laboratoire. Déjà, des pigments visuels (Paquin, 1983) et photosynthétiques (Robert & coll., 1985) avaient été incorporés avec succès dans des bicouches asymétriques. Des mélanges PE-nonactine 5000:1 (mol/mol) furent ainsi déposés sur solution saline de KCl 100 mM tamponnée à pH=7. Les bicouches obtenues, au nombre de 9, montraient toutes une conductance beaucoup plus élevée que celles formées à partir de films phospholipidiques purs. La conductance mesurée était égale à $25 \pm 20 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$, soit environ 200 fois la valeur de conductance de bicouches non dopées. La nonactine médie donc effectivement le transport d'ions K^+ , mais la hausse mesurée est-elle comparable à celle mesurée dans d'autres laboratoires ? Feuilletant la littérature sur le sujet, nous nous aperçûmes alors que nous étions les seuls à procéder de cette manière ! Les autres équipes procèdent à l'incorporation de la nonactine en injectant la nonactine dans la phase aqueuse *après* la formation de la bicouche. L'injection se fait simultanément dans chacun des bassins et la quantité injectée est telle que la concentration de nonactine dans le coeur de phase est la même de part et d'autre de la bicouche. Cette concentration se situe généralement entre 1 nM et 1 μM . Le principal avantage de ce procédé réside en la possibilité de bien caractériser la bicouche lipidique *avant* l'incorporation et ainsi de mesurer plus facilement l'effet du constituant (transporteur, drogue ou autre) sur la membrane.

Nous présentons à la **figure 5.7**, le tracé original de la montée de conductance lors d'ajouts successifs de nonactine. À l'extrême gauche, le courant mesuré est très faible (de l'ordre d'un pA), valeur typique d'une bicouche lipidique pure. Puis, nous injectons vers la 53^e minute un premier volume de nonactine du côté trans. La conductance demeure faible. Nous injectons ensuite un volume un peu plus faible de nonactine dans le compartiment cis³⁵. Cette fois le courant augmente de plusieurs ordres de grandeur. Après avoir, à deux reprises, ajusté l'échelle de conductance, nous injectons de chaque côté un nouvel aliquot de nonactine, puis vers la 71^e minute, nous procédons à un cinquième et un sixième ajout de transporteur. Les phases aqueuses sont agitées durant toute la durée de l'enregistrement.

Trois constatations s'imposent: i) les ajouts en cis affectent de manière beaucoup plus sensibles le courant, ii) le temps requis pour que la conductance atteigne sa valeur d'équilibre est de l'ordre de 15 minutes et iii) la conductance à l'équilibre est grosso modo proportionnelle à la concentration de nonactine dans la phase aqueuse. Cette dernière constatation semble indiquer que la concentration de complexes dans la bicouche est proportionnelle à la concentration de nonactine dans la phase aqueuse, ce qui serait en accord avec l'équation 2.27. La première constatation intrigue au premier abord mais rappelons-nous que l'effet de la concentration sur le courant I est entièrement "traduit" par le facteur $(C_0e^V - C_d)$ apparaissant au numérateur des équations 2.35 (Nernst-Planck) et 2.61 (Eyring). Or, pour des tensions supérieures à 25 mV ($v > 1$), ce qui est le cas en l'occurrence, le premier terme l'emporte sur le second et ainsi seule la concentration en cis détermine le niveau de conductance de la bicouche. Évidemment cela n'est vrai que si le rapport γ ne devient pas démesurément grand. Quant à la deuxième constatation, elle est reliée au coefficient de diffusion de la nonactine dans le coeur de phase et aux conditions d'agitation.

Le tracé de la figure 5.7 ne bouleverse rien mais de procéder à six ajouts de nonactine, sans que la bicouche ne casse, tient de l'exceptionnel. Six fois se mettre à la terre, retenir sa respiration, passer la seringue au travers de l'interface; six fois espérer que l'arrivée de nonactine ne déstabilise pas la bicouche; surveiller l'agitation, choisir les échelles de mesures, jauger la bicouche. Bref, forcer le dialogue avec une structure qui ne songe qu'à nous faire faux bond !

³⁵ Afin d'obtenir la même concentration finale dans chaque bassin, nous avons injecté du côté cis une quantité de nonactine 12% plus faible que du côté trans car le bassin cis contient, lorsque les niveaux d'eau sont au-dessus de l'orifice, un volume d'eau 12% inférieur à celui en trans.

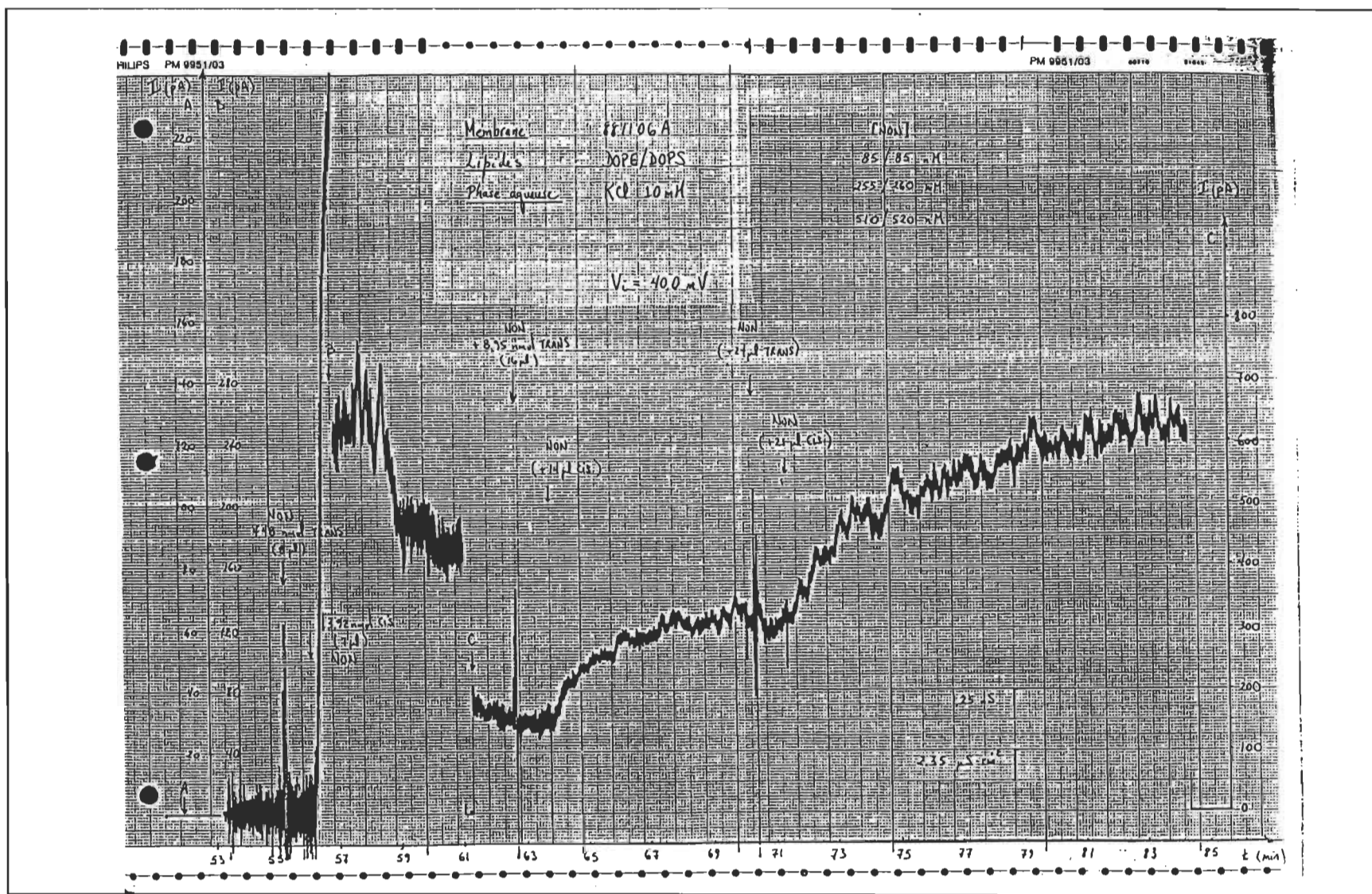


Figure 5.7. – Enregistrement en fonction du temps de la conductance à faible tension d'une bicouche phospholipidique asymétrique dopée à la nonactine. Ajouts successifs de transporteur. Les lettres A, B et C réfèrent aux différentes échelles de courant utilisées.

Nous avons pu mesurer la conductance à l'équilibre de 52 bicouches seulement. Les valeurs de conductance sont regroupées, pour la plupart, au **tableau 6**. Pour faciliter la comparaison entre les différentes conditions expérimentales, nous avons normalisé la conductance spécifique en la divisant par le produit de la concentration de nonactine (voir point iii précédent) et de la concentration de l'ion perméant (K^+) dans la phase aqueuse. Nous avons ainsi une conductance reflétant plus directement les propriétés de la bicouche dopée. Signalons que les mesures de conductance apparaissant au tableau 6, ont été prises entre +30 et +50 mV.

Tableau 6
Conductance normalisée de bicouches dopées à la nonactine

Lipides	Phase aqueuse mM	$G_s / \{[Non][K^+]\}$ $S \cdot cm^{-2} \cdot M^{-2}$	N	Étendue de G_s normalisé $S \cdot cm^{-2} \cdot M^{-2}$
<i>Zwitterioniques</i>				
DOPC / DOPC	KCl 100	19 000	2	12 000-26 000
DOPE / DOPE	KCl 10	1800	6	1000-2300
DOPE / DOPE	KCl 10+LiCl 90	700	3	650-750
DOPE / DOPE	KCl 100	750	4	350-1000
<i>Zwitterioniques / Chargés</i>				
DOPE / DOPG	CaCl ₂ 50+KCl X ‡	2250	3	2200-2300
DOPE // DOPS	KCl 10	13 500	5	6200-25 000
DOPS / DOPE	KCl 10+LiCl 90	3000	2	2400-3600
DOPE / DOPS	KCl 100	~2100	10	700-8200
<i>Chargés / Chargés</i>				
PS-H / PS-H	KCl 10+LiCl 90	~150 000	2	45 000-265 000

‡ Lors de ces expériences, nous avons formé la bicouche entre deux compartiments remplis d'une solution de CaCl₂ 50 mM et nous avons injecté de petits volumes d'une solution concentrée de KCl.

5.4.1 Variabilité des mesures de conductance

Ce qu'il faut d'abord remarquer, dans ce tableau, c'est la grande variabilité des mesures (colonne 5). Même si le nombre de bicouches dopées est inférieur à 10 (colonne 4), l'étendue des valeurs de conductance s'étend parfois sur plus d'un ordre de grandeur (dernière ligne, par exemple). En ce qui concerne les bicouches DOPE/DOPS sur KCl

10 mM (ligne 6), une partie de ces écarts peut s'expliquer par le fait que la conductance fut mesurée à des tensions positives, peu importe le sens de l'asymétrie mais qu'en est-il pour les autres types de bicouches ? Serait-ce que les conditions d'agitation diffèrent d'une bicouche à l'autre ? Cela est peu probable puisque des expériences menées sur une bicouche donnée montrent que des conditions extrêmes d'agitation n'amènent en général que de faibles variations (de l'ordre de 15%) de la conductance mesurée. Serait-ce que le coefficient de partage de la nonactine varie d'une expérience à l'autre ? Peut-être mais pourquoi ce coefficient varierait-il d'une bicouche à l'autre ? Serait-ce encore que l'épaisseur de la région hydrophobe varie d'une bicouche à l'autre ? Les mesures de capacité des bicouches dopées ne diffèrent pas des bicouches non dopées (rejoignant en cela les résultats de Pickar & Brown (1983), utilisant l'ion liposoluble dipicrylamine), les variations de capacité sont toujours aussi importantes, sinon plus. L'organisation différente des micelles dans le tore affecterait-elle aussi la conductance médiée par la nonactine ? Possiblement, mais par un ordre de grandeur ? Serait-ce plutôt qu'une quantité toujours différente de nonactine se lie aux films lipidiques causant ainsi une variation de la concentration dans le coeur de phase ? Vu la petite quantité de nonactine injectée ($100 \text{ nM} \cong 3 \cdot 10^{15}$ molécules) et la grande surface hydrophobe disponible à la surface ($\cong 25 \text{ cm}^2$), cette hypothèse n'est pas à dédaigner. D'autant plus que des mesures utilisant la technique des films monomoléculaires montrent que la nonactine s'adsorbe fortement sur les films phospholipidiques à l'interface air-eau (résultats non présentés).

L'hypothèse la plus plausible, selon nous, repose sur une variation de la concentration de nonactine dans la phase aqueuse. L'hypothèse concurrente, voulant que la zone périphérique (le tore) affecte la conductance suite à une variation de l'épaisseur hydrocarbonée, peut difficilement rendre compte de la grande étendue des valeurs de conductance. Les théories de Nernst-Planck et de Eyring prévoient que la conductance est inversement proportionnelle à la distance de transport. Or, nous doutons qu'une variation de quelque 0,3 nm de l'épaisseur de la zone hydrophobe puisse faire varier la conductance jusqu'à un facteur dix. (La vitesse de transport de la nonactine ne peut dépendre à ce point de la distance !) Restent encore les trois possibilités suivantes: i) variation d'une bicouche à l'autre du coefficient de partage, ii) variation d'une bicouche à l'autre de la barrière de potentiel que rencontre la nonactine et iii) variation de la concentration de nonactine dans le coeur de phase. Il est facile d'invoquer d'autres explications, telles la migration de la

nonactine vers la zone périphérique ou encore des variations de viscosité d'une bicouche à l'autre mais faute d'informations supplémentaires, nous nous arrêterons ici.

Il est intéressant de mentionner que les données de conductance normalisée de films noirs dopés à la nonactine se révèlent, elles aussi, plutôt disparates. Ainsi pour des films noirs de même composition (PE de bactérie en solution dans le décane), limités par une même phase aqueuse (KCl 100 mM), nous relevons des valeurs allant de $30 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{M}^{-2}$ (Hall & coll., 1973) à $400 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{M}^{-2}$ (Hladky, 1974) en passant par $150 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{M}^{-2}$ (Szabo & coll., 1972). Un écart similaire se retrouve entre les données de conductance de films noirs de PG dans le décane dopés à la nonactine (McLaughlin & coll., 1970 et Szabo & coll., 1972). Quelle est l'incertitude sur les valeurs fournies ? Nous n'en savons rien, les auteurs n'ayant ni mentionné le nombre de mesures, ni l'étendue, ni l'écart-type. Le fait que ce manque de précision soit généralisé à l'ensemble de la littérature touchant les bicouches planes dopées avec des transporteurs (ou avec des ions liposolubles) nous porte à croire que ces variations peuvent être importantes (et au demeurant inexplicables). Bref, nous n'avons aucune raison de présumer que les données apparaissant au tableau 6 soient inhabituelles.

5.4.2 Détermination du potentiel de Gouy

Depuis le début des années '70 (McLaughlin & coll., 1970), et aujourd'hui encore (Cukierman, 1991), ces données de conductance à faible tension - appelées improprement « zero current conductance » - sont recueillies dans le but d'estimer le potentiel de Gouy à la surface de bicouches chargées. À partir du rapport des conductances de *deux* bicouches *symétriques* de différente composition, l'une chargée et l'autre pas, nous pouvons calculer, via l'équation 5.1, le potentiel de Gouy de la bicouche chargée.

$$\varphi_1 - \varphi_2 = - \ln \frac{G(\varphi_1)}{G(\varphi_2)} \quad [5.1]$$

- φ_1 : potentiel de Gouy à la surface d'une bicouche symétrique de composition 1 (mV)
- φ_2 : potentiel de Gouy à la surface d'une bicouche symétrique de composition 2 (mV)
- $G(\varphi_1)$: conductance d'une bicouche symétrique de composition 1 dopée à la nonactine (S)
- $G(\varphi_2)$: conductance d'une bicouche symétrique de composition 2 dopée à la nonactine (S)

Cette équation cache de nombreuses suppositions (même coefficient de partage pour les deux bicouches, potentiels dipolaires identiques, même énergie de Born, même épaisseur,

tension appliquée négligeable devant la hauteur de la barrière de potentiel, etc.) mais utilisons-la en première approximation pour estimer la différence de potentiel entre les bicouches de PS hydrogénée (ligne 9) et les bicouches de DOPE formées dans les mêmes conditions salines (ligne 3). Nous obtenons, une différence de potentiel de -137 mV. Si le potentiel dipolaire des deux lipides est identique (etc., etc.) et que nous considérons la PE comme étant globalement neutre au pH de l'expérience, le potentiel de Gouy à la surface d'une bicouche de PS hydrogénée serait de -140 mV environ. Poursuivons l'exercice (pédagogique sans plus) en nous demandant ce qu'il adviendrait de la conductance d'une bicouche asymétrique DOPE/PS. Supposons de manière tout à fait grossière que la conductance de la bicouche asymétrique est proportionnelle à l'exponentielle du potentiel moyen au centre d'une barrière de potentiel trapézoïdale couvrant, disons 75%, de la distance sur laquelle le transporteur fait la navette. La différence de potentiel entre les coins du trapèze serait donc de 105 mV environ (le coin le plus bas se situant sur le feuillet de PS). Si nous supposons que la hauteur de barrière du côté DOPE est de 300 mV, nous obtenons une hauteur moyenne approximativement de 250 mV (soit environ 10 kT). La différence des potentiels moyens entre une bicouche DOPE/DOPE et DOPE/PS serait ainsi de 2 kT et le rapport des conductances, donné par l'exponentielle de la différence de potentiel, serait donc d'un peu plus de 4. La valeur prédite d'une bicouche DOPE/PS serait donc de $3000 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{M}^{-2}$. Si nous faisons l'hypothèse que la DOPS se comporte, électrostatiquement parlant, comme la PS hydrogénée nous pouvons donc affirmer que la valeur de 300 mV donnée à la hauteur de barrière du côté PE permet de rationaliser les données de conductance apparaissant aux lignes 3, 7 et 9 du tableau 5.

Toujours dans le sillage de l'expression 5.1, il appert que les variations de conductance ne sont pas si catastrophiques qu'il n'y semblait d'entrée de jeu. En autant évidemment que les moyennes diffèrent d'un ordre de grandeur ou plus; autrement dit, que les différences de potentiel à mesurer sont de l'ordre de 60 mV. Il est aberrant par contre de prétendre détecter au dixième de mV près des valeurs absolues de différences de potentiel en deçà de 10 mV. C'est pourtant ce que rapporte M.T. Tosteson (1978) en "suivant" l'incorporation d'une protéine chargée, la glycophorine, dans des films noirs de PE de bactérie au décane...

Il faut aussi souligner que la détermination du potentiel de Gouy par cette méthode requiert l'obtention de données moyennes fiables sur des bicouches de différentes compositions. Elle est inadéquate pour des bicouches asymétriques ou encore mal caractérisées (rapport

de conductance de *deux types* de bicouches). Nous verrons, dans les sections suivantes, que nous pouvons obtenir cette information sur le potentiel de Gouy et d'autres aussi importantes encore, et de manière plus précise, à partir d'une seule courbe courant-tension prise sur une seule bicouche.

5.5 Courbes I-V de bicouches phospholipidiques dopées

La conductance à faible tension de la bicouche est maintenant stationnaire, sa mesure est prise. Nous voilà rendus à la dernière phase de l'expérience: l'obtention de la courbe courant-tension de la bicouche dopée. C'est à cette étape que le "dialogue" se fait le plus serré; c'est ici qu'il est le plus riche, également. Rappelons que ce n'est qu'à partir de cette courbe I-V que nous pourrions caractériser la barrière de potentiel.

Est-il encore nécessaire de répéter que la prise de ces courbes courant-tension n'est pas chose acquise ? que la bicouche est une structure instable susceptible de se briser à tout moment ? Est-il nécessaire d'affirmer que le jugement de l'expérimentateur doit être plus que jamais mis à contribution lors de la susdite prise de mesure ? Toujours est-il qu'environ cent cinquante courbes furent obtenues sur une quarantaine de membranes.

Une première courbe I-V est présentée à la **figure 5.8**. Elle fut prise sur une bicouche DOPS/DOPE formée au premier essai, vingt-cinq minutes après la déposition des films. La nonactine fut injectée autour de la 35^e minute et la courbe I-V prise entre la 69^e et la 71^e minute suivant la formation de la bicouche. La courbe montre une asymétrie bien marquée (le rapport de rectification à 150 mV est de 2,3) mais aucune trace de discontinuité dans le premier quadrant. La courbe expérimentale 880630A6 ne correspond manifestement pas à la relation $I(V)$ prédite par la théorie de Eyring. Nous verrons plus loin qu'elle peut au contraire être très bien lissée par une fonction à la Nernst-Planck.

Regardons maintenant le sens de l'asymétrie. Pour une tension V donnée, le courant de cis vers trans est supérieur à celui de trans vers cis. Le côté cis étant chargé négativement, nous retrouvons une concentration d'ions perméants (ici des ions K^+) beaucoup plus grande de ce côté que du côté trans. Intuitivement, nous pouvions nous attendre à un tel effet. À un second degré (niveau de pensée "Eyring"), on peut affirmer que la hauteur de la barrière

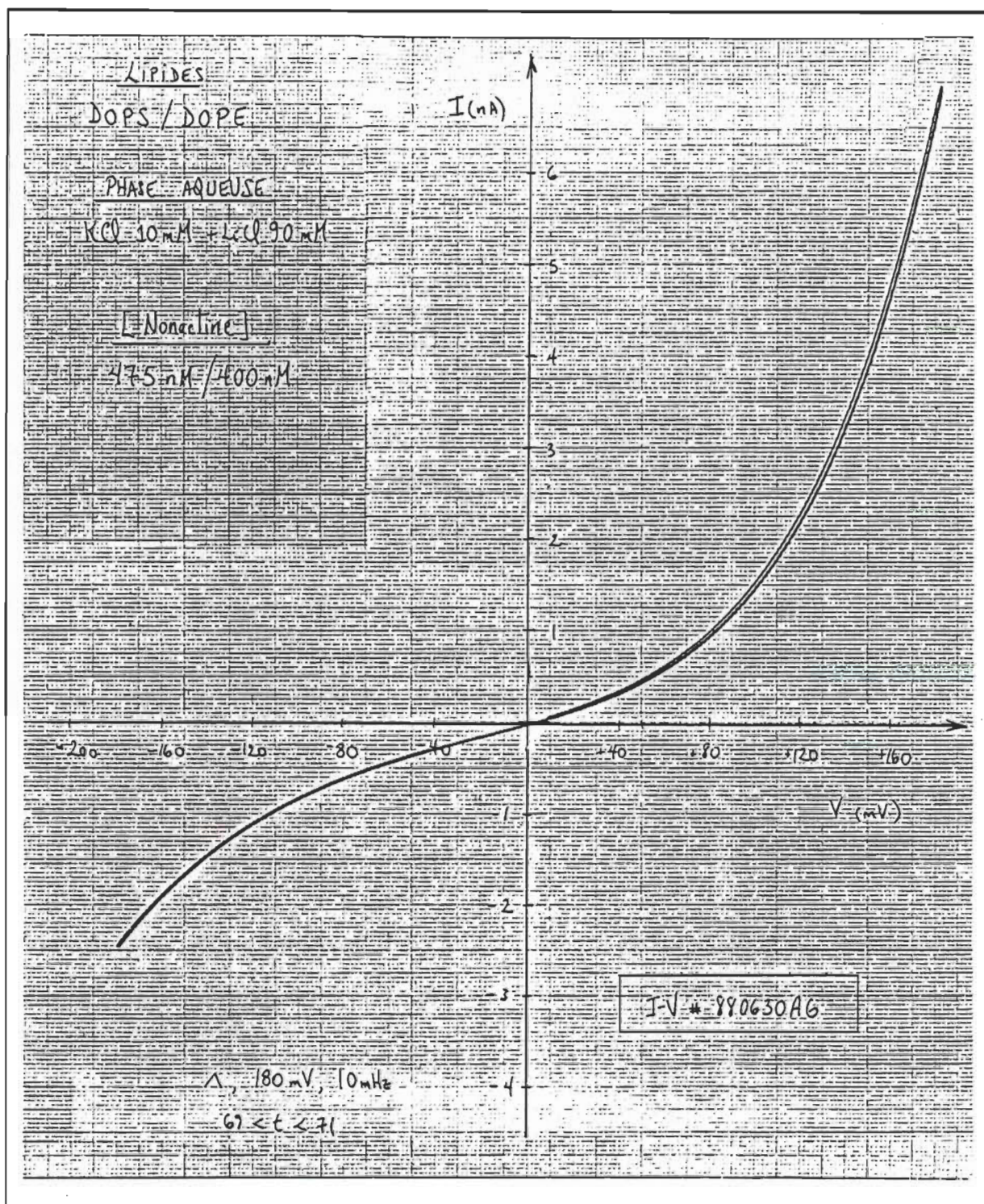


Figure 5.8. – Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique dopée à la nonactine montrant une asymétrie positive. La courbe montre une légère hystérèse dans le premier quadrant. Le rapport de rectification R à 150 mV est de 2,3. Le rapport des concentrations γ est égal à 0,84. Le diamètre de l'orifice est de 270 μm . Température de la phase aqueuse: 25°C.

que rencontre l'ion K^+ passant de cis vers trans est plus faible pour une tension positive que pour une tension négative. Or cette situation ne se produit que si la hauteur de la barrière intrinsèque du côté cis, ϕ_1 , est inférieure à la hauteur en trans, ϕ_2 .

Nous arrivons à ce même résultat de manière plus directe, quoique plus abstraite, en examinant les relations dérivées selon l'approche de Nernst-Planck. Ainsi, à partir des équations 2.43 et 2.36, nous pouvons démontrer que le rapport R^* (ou R si γ est voisin de 1) est supérieur à l'unité si le signe de V est le même que celui de $\Delta\phi$. Le rapport R étant supérieur à 1 dans le premier quadrant, nous pouvons immédiatement conclure que $\Delta\phi$ est positif ($\phi_1 < \phi_2$).

Si nous faisons ensuite l'hypothèse que cette variation de la hauteur des coins est exclusivement due au champ transmembranaire causé par les potentiels des doubles couches (voir équation 2.15) - autrement dit que la somme des autres potentiels (dipolaire, de Born, des forces-images, de distribution, hydrophobe) demeure constante entre n_1 et n_2 , nous en arrivons à la conclusion que le potentiel de Gouy à la surface du côté cis est plus négatif que celui du côté trans. Effectivement cela est le cas pour une bicouche du type DOPS/DOPE. L'asymétrie de la courbe I-V présentée à la figure 5.8 est donc conforme au sens de l'asymétrie de charges de la bicouche étudiée.

Il en est de même à la **figure 5.9**. Nous y retrouvons une courbe courant-tension d'une bicouche DOPE/DOPS formée après plusieurs essais. Le lipide chargé négativement se retrouve maintenant en trans et, si le potentiel de Gouy est seul en cause, la différence de potentiel $\Delta\phi$ est négative. Par conséquent, l'asymétrie de la courbe doit être telle que les plus forts courants se retrouvent dans le quadrant III (tensions négatives). L'asymétrie est nette et dans le sens escompté.

La courbe I-V, présentée à la figure 5.9, ne montre aucune discontinuité et ne peut par conséquent être expliquée par la théorie de Eyring. Il suffit de jeter un coup d'oeil sur la figure 2.20 pour s'en convaincre. L'on peut toujours rétorquer que pour $n_1 = n_2 = 0,5$ (barrière triangulaire), la théorie de Eyring prédit une courbe I-V sans discontinuité. Le problème c'est que dans ces conditions (voir équation 2.60), $R(v)$ est égal à une constante ! Cela n'est évidemment pas le cas.

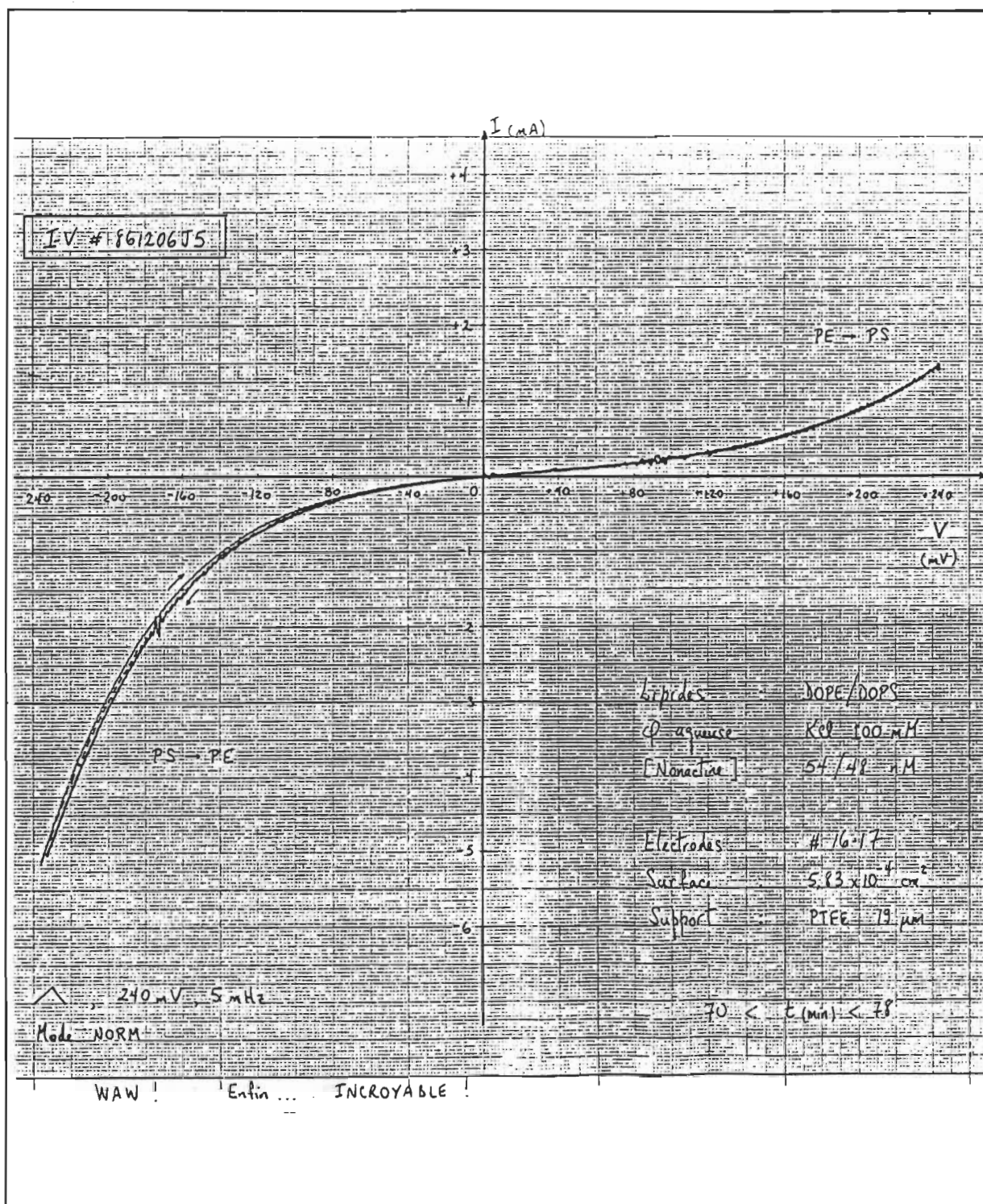


Figure 5.9. – Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique dopée à la nonactine montrant une asymétrie négative. Le rapport de rectification à 150 mV est de 0,36. La courbe montre une légère hystérèse dans le quadrant III. Le pointillé apparaissant à l'intérieur du cycle correspond au second passage de la plume. Le diamètre moyen de l'orifice est de 272,5 μm .

À ce stade, il est intéressant de noter qu'aucune des 150 courbes I-V enregistrées n'a montré de discontinuité, ne serait-ce qu'un soupçon de discontinuité. Statistiquement, cela est très significatif. Nous ne comprenons pas par ailleurs que des auteurs, tels James Hall et Ramon Latorre, s'obstinent à traiter leurs courbes courant-tension à l'aide de la théorie de Eyring. Courbes qui soit dit en passant ne se distinguent pas des nôtres, sans discontinuité donc. À vrai dire, le fait que la théorie de Eyring ne passe pas la "rampe expérimentale" ne nous chagrine aucunement. La théorie de Nernst-Planck est plus riche et plus cohérente que celle de Eyring, disions-nous à la fin du chapitre 2. Nous aurions pu dire aussi que les prédictions de la théorie de Nernst-Planck collent mieux à l'image physique que nous avons d'une membrane (un milieu sans discontinuité marquée) que celles de la théorie de Eyring. La Nature n'a que faire des segments de droite. La Nature a horreur du vide, entendions-nous à une époque...

Les courbes représentées aux figures 5.8 et 5.9 sont des courbes courant-tension typiques. Rien ne les différencie des autres courbes obtenues de bicouches asymétriques, de même composition ou de composition différente. En ce qui concerne les courbes I-V tirées de matrices lipidiques symétriques, elles sont évidemment symétriques et peuvent être toutes rapprochées à la courbe apparaissant à la figure 2.14. Contrairement à ce que prédit la théorie de Eyring, aucun point d'inflexion ne fut observé...

Dans le but de mettre en relief certaines propriétés liées au transport ionique, nous présenterons ici deux expériences particulières. Regardons, dans un premier temps, la courbe reproduite à la **figure 5.10**. La courbe I-V présentée est particulière en ce sens qu'elle tient plus d'un exploit digne du livre des records que d'une courbe I-V. Nous avons sur papier, et le trait ne saurait mentir, une cycle I-V complet de -300 mV à +300 mV ! Une amplitude de 60 mV supérieure aux meilleures courbes I-V présentées dans la littérature, bicouches Montal-Mueller et Mueller-Rudin confondues.

Mieux encore, aucun saut de conductance n'est observé à la figure 5.10. Tout au plus discernons-nous une légère hystérèse. Cela est intéressant car nous balayons ici à une vitesse de $12 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ et que même à cette vitesse (en général les autres courbes furent enregistrées à des vitesses bien moindres), les concentrations de transporteur ne varient pas ou peu en fonction du temps (s'il en était autrement, la courbe I-V s'écarterait notablement du passage précédent). Il semble donc que l'hypothèse de l'état stationnaire, hypothèse de

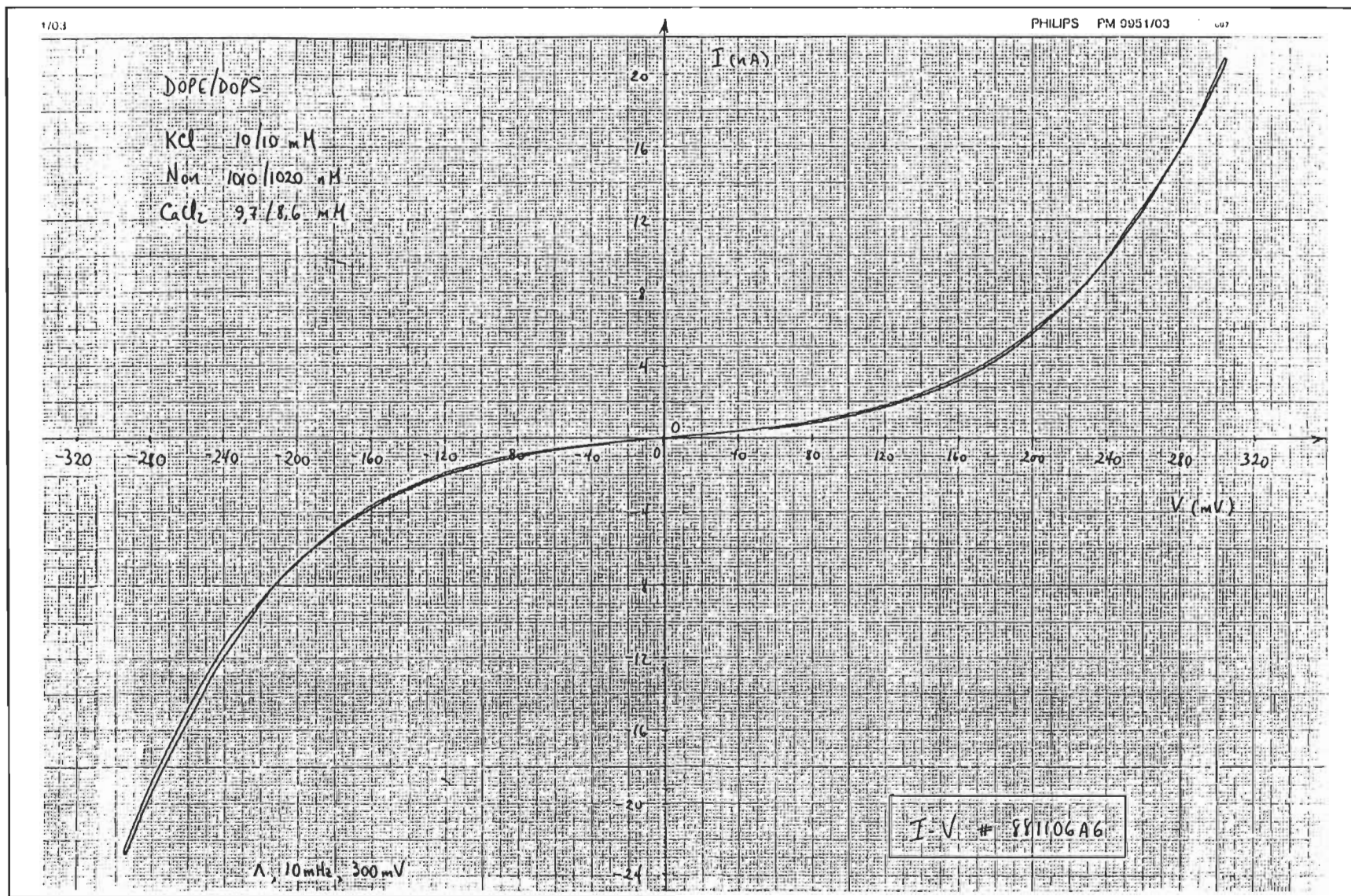


Figure 5.10. – Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique dopée à la nonactine: excursion à haute tension. Bicouche formée au premier essai. Cette courbe fut prise entre la 144^e et la 146^e minute. Diamètre de l'orifice: 260 μ m.

base de la théorie de Nernst-Planck, soit vérifiée. Sur l'intervalle de temps considéré hâtons-nous d'ajouter, car des fréquences de balayage plus élevées pourraient causer des cycles d'hystérèse qui ne sauraient être tenus en ligne de compte par la théorie développée au chapitre 2. L'étude de ces cycles, sur d'autres assises théoriques, pourrait cependant apporter de précieux renseignements sur la cinétique des différentes étapes du mécanisme d'action du transporteur.

À ce propos, il est intéressant de mentionner que la courbe ne devient pas sublinéaire même pour des tensions aussi élevées que 300 mV. Le fait qu'en plus la courbe I-V conserve une même forme sur toute la gamme de concentration de potassium utilisé montre bien que les réactions interfaciales (de complexation et de dissociation) sont à l'équilibre et ne constituent pas une étape limitante du mécanisme de transport de la nonactine (pour une bonne discussion de ce point voir Hall & coll., 1973). Pour l'ensemble des expériences menées dans cette étude, l'équation déterminant la concentration de complexes dans la membrane (équation 2.27) serait donc valide. Tel qu'annoncé au chapitre 3, nous nous retrouvons dans des conditions où l'étape de translocation est l'étape limitante de la réaction.

Le lecteur attentif aura sûrement remarqué que la courbe apparaissant à la figure 5.10 est symétrique mais que la composition de la bicouche est identique à celle de la figure précédente, laquelle montre un visage bien asymétrique. Il en était ainsi de la bicouche 881106A avant que l'on procède à l'ajout de CaCl_2 du côté trans. Ce faisant, nous avons diminué considérablement le potentiel de Gouy à la surface du côté de la DOPS; d'une part par effet d'écran (diminution de ψ_0 sans modification de la densité de charge σ), mais aussi par adsorption des ions calcium sur le feuillet de PS (diminution de σ et par conséquent de ψ_0). Les deux potentiels devenant comparables, le champ électrique transmembranaire causé par la présence de la double couche est devenu très petit, et par conséquent, l'écart entre la valeur absolue des courants positifs et négatifs aussi.

La courbe obtenue à la figure 5.10 montre également que les expériences sur des bicouches Montal-Mueller sont remplies d'aléas. L'on peut peiner une semaine durant sans former une seule membrane stable et fabriquer le lendemain une bicouche à toute épreuve semblable à celle du 6 novembre 1988 (881106A). Ce n'est d'ailleurs qu'après avoir appliqué une tension continue de 330 mV pendant une minute qu'elle a rendu grâce... après 192 minutes de loyaux services !

Examinons maintenant, la courbe I-V apparaissant à la **figure 5.11**. Il s'agit d'une bicouche symétrique (DOPE/DOPE) mais dont l'allure de la courbe I-V est proprement asymétrique (le rapport de rectification à 140 mV est de 11). Cela s'explique aisément car la bicouche a été formée dans des conditions salines asymétriques. Le bassin cis est rempli d'une solution de KCl 100 mM alors que le bassin trans contient un mélange de KCl 10 mM et de LiCl 90 mM. La force ionique de chaque côté de la bicouche est pratiquement la même mais la concentration de l'ion perméant est de dix fois inférieure du côté trans. Puisque la concentration de nonactine dans le bassin trans est de 10% inférieure à celle dans le bassin cis, nous avons donc un rapport de la concentration de complexes γ égal à $0,1 \cdot 0,90$, soit 0,090. La courbe I-V devrait donc couper l'axe des tensions à $V = RT/3 \cdot \ln \gamma$, soit à -61 mV. La courbe I-V expérimentale passe effectivement près de -61 mV (une mesure précise à l'électromètre donna - 61 mV). Nous avons donc l'assurance: i) que l'ion K^+ est bien l'ion transporté par la nonactine et ii) que le coefficient d'activité du KCl à 10 mM est le même qu'à 100 mM.

Quant à la rectification, elle n'est causée que par cette asymétrie des solutions aqueuses. En effet, si nous calculons à partir de l'équation 2.42 le rapport de rectification normalisé R^* (qui normalise l'effet du rapport des concentrations), nous aurons $R^* = R\gamma = 0,99$. La différence de potentiel entre les deux coins de la barrière trapézoïdale ($\Delta\phi$) est par conséquent pratiquement nulle. À une bicouche de constitution symétrique, correspond bien une barrière de potentiel symétrique.

Passons maintenant à la dernière étape du projet: la caractérisation de la barrière de potentiel de bicouches asymétriques. Dans un premier temps, nous verrons à l'aide d'un exemple comment cette caractérisation s'effectue. Puis dans un deuxième temps, nous présenterons l'ensemble des résultats obtenus. Finalement, nous comparerons les potentiels transmembranaires évalués avec ceux prédits par la théorie de Gouy-Chapman-Stern.

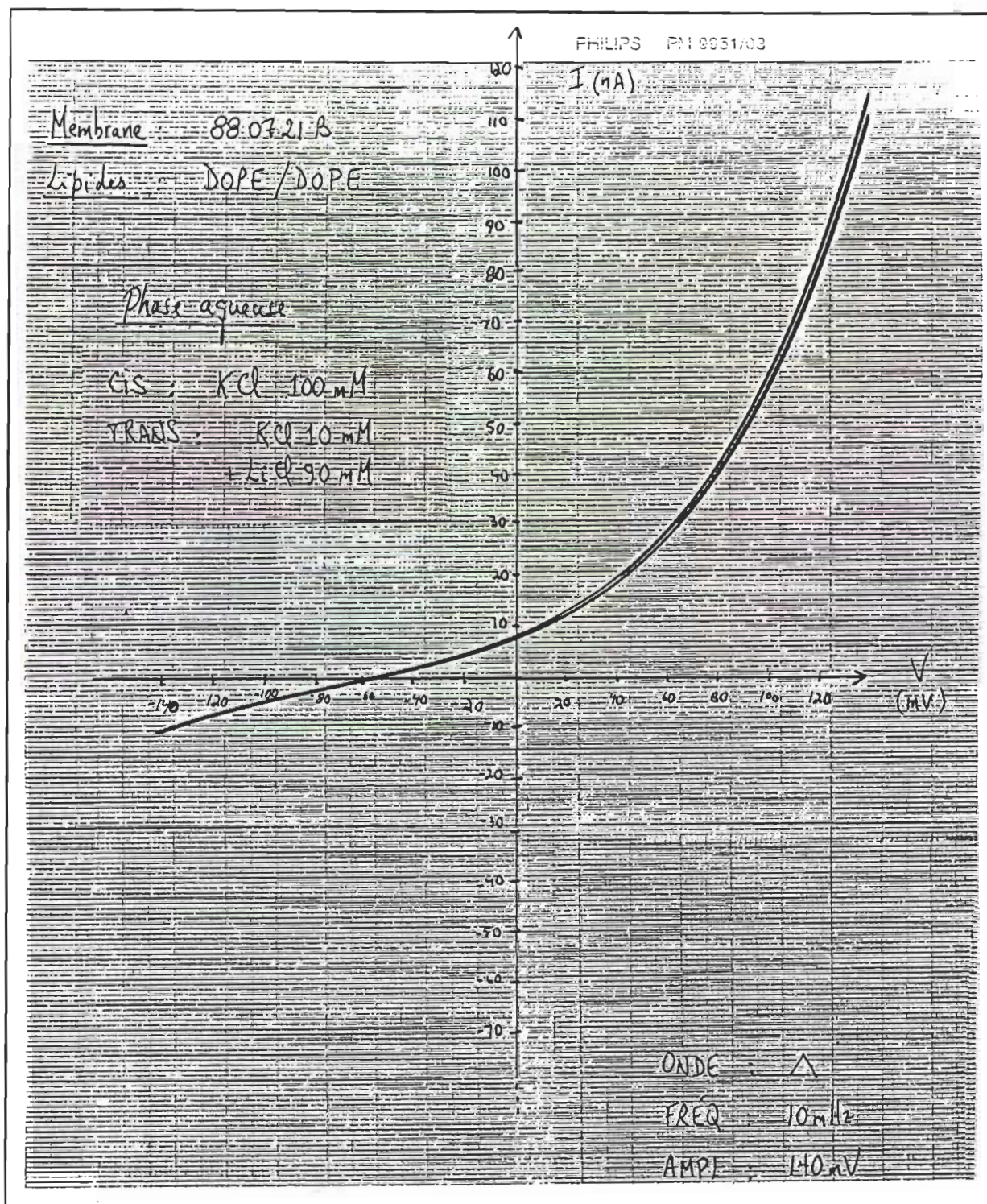


Figure 5.11. – Courbe I-V originale d'une bicouche phospholipidique dopée à la nonactine. Effet du rapport de concentration d'ions K^+ . La concentration de nonactine dans les bassins cis et trans est de 490 et 440 nM, respectivement. Le potentiel d'inversion est de -61 mV. La même courbe prise 30 minutes plus tard coupa l'axe des abscisses au même endroit. Diamètre de l'orifice: 270 μ m.

5.6 Caractérisation des barrières de potentiels

5.6.1 Caractérisation typique d'une barrière de potentiel à partir d'une courbe I-V

La courbe que nous allons traiter ici provient d'une bicouche DOPS/DOPE formée au premier essai. Elle porte le nom de code 881106B. Entre la bicouche 881106A, dont la courbe I-V record fut présentée à la figure 5.10, et celle-ci, nous avons vidé puis nettoyé les baignoires, puis installé un nouveau support avec un nouveau trou et un nouvel enduit. Après avoir rempli les baignoires de la même solution saline (KCl 10 mM), nous avons redéposé les films lipidiques mais en intervertissant les films cette fois. Nous avons ainsi déposé $2,00 \cdot 10^{16}$ molécules de DOPE du côté trans et un même nombre de molécules de DOPS du côté cis. La bicouche 881106B fut formée en élevant les niveaux trans et cis 39 minutes après la déposition des films. Les niveaux d'eau furent ajustés à une hauteur de 500 μm environ au-dessus de la partie supérieure de l'orifice. Le diamètre de celui-ci était de 260 μm et le support en téflon d'une épaisseur de 19 μm .

La capacité spécifique mesurée à 13 minutes fut de $837 \text{ nF} \cdot \text{cm}^{-2}$, ce qui correspond à une épaisseur de la région hydrophobe de 2,3 nm (toujours dans l'éventualité que la permittivité relative de la région hydrocarbonée est de 2,2 et que l'influence des régions polaires sur la capacité est négligeable).

L'addition de nonactine s'est effectuée en deux étapes: à la 45^e minute suivant la formation de la membrane nous avons injecté 13,4 nanomoles dans le compartiment trans et 11,8 nanomoles dans le compartiment cis et à la 58^e minute nous avons récidivé, toujours dans le même ordre, avec 12,9 nanomoles et 10,1 nanomoles de nonactine. Compte tenu du volume de chacun des compartiments, la concentration finale de nonactine dans les baignoires cis et trans devrait être de 500 et 510 nM respectivement. Si nous considérons maintenant un même coefficient de partage de la nonactine sur chacune des interfaces et puisque la constante d'association nonactine- K^+ est identique dans les deux compartiments, nous pouvons calculer le rapport de la concentration de complexes du côté trans sur celle du côté cis. Le rapport γ serait donc ici de 1,02. La conductance spécifique de la bicouche dopée fut trouvée égale à $115 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($t = 80 \text{ min}$).

Nous avons vu au chapitre II que le courant I dépendait de six paramètres: K_{NP} , γ , ϕ_1 , $\Delta\phi$, n_1 et n_2 . Puisque nous connaissons γ , nous n'avons que cinq paramètres à déterminer. Pouvons-nous déterminer ces cinq paramètres à partir d'une courbe I-V ? Procédons de manière intuitive. D'une droite, deux coefficients peuvent être déterminés: la pente et l'abscisse à l'origine. D'une parabole, trois coefficients et ainsi de suite. Une courbe I-V symétrique peut être lissée par une cubique. Quatre coefficients peuvent en principe être tirés de cette courbe. Au moins un de plus si la courbe I-V est asymétrique. Mais il faut faire attention, la fonction $f(x) = ax^3$ est une cubique mais caractérisée par un seul coefficient, le coefficient a , les autres étant égaux à 0. Une courbe I-V symétrique est une cubique ne possédant pas d'extrémum. Nous pouvons en avoir une bonne image avec l'abscisse à l'origine, la pente de la tangente à ce point et le degré de courbure de la courbe (la dépendance de la conductance à la tension). Trois coefficients donc. Mais puisque la courbe passe près de l'origine ($\gamma \approx 1$), nous ne pouvons nous attendre à déterminer précisément plus de deux coefficients. Dans le cas d'une courbe I-V asymétrique, un troisième paramètre peut être déterminé. Sachant que la constante K_{NP} et le paramètre ϕ_1 (ou ψ_1) sont étroitement reliés, nous nous retrouvons avec quatre paramètres à déterminer. Le jeu sera donc serré.

La constante K (nous laisserons tomber l'indice NP à partir d'ici) pouvant être calculée à partir de données empiriques, nous avons choisi de la fixer et de faire varier ψ_1 . Les autres variables choisies sont $\Delta\psi_d$, n_1 et n_2 . S'il est impossible de déterminer ces quatre paramètres, nous poserons $n_2=1-n_1$ et nous déterminerons ψ_1 , $\Delta\psi_d$, et n_1 .

La constante K est donnée par l'équation 5.2 :

$$K = \frac{3 A D K_A^W \gamma_{is} C_i^W C_s^W}{d} \quad [5.2]$$

où les concentrations C_i^W et C_s^W réfèrent aux concentrations dans le compartiment cis de KCl et de nonactine respectivement. Ces concentrations sont connues de même que la surface de la bicouche A . La détermination de K nécessite également la connaissance de la distance de translocation d . Compte tenu de l'épaisseur de la région hydrophobe, compte tenu de la taille du complexe nonactine- K^+ , compte tenu de la forme de la barrière de potentiel entrevue à la section 2.1.6, compte tenu enfin des propriétés respectives des

phospholipides et de la nonactine, nous croyons qu'une distance de l'ordre de 3,0 nm est tout à fait raisonnable.

En ce qui concerne le coefficient de partage, nous avons pris une valeur de 5000 (Hladky, 1974), valeur communément admise dans le domaine. Il faut bien se rendre compte ici que de poser un coefficient de partage égal à 5000 revient à poser une énergie potentielle neutre égale à $-8,5 \text{ kT}$ ³⁶. La barrière de potentiel que nous déterminerons ne comprendra donc pas cette composante "hydrophobe". Pour la constante de complexation dans la phase aqueuse nous avons utilisé la même valeur que Schoch & coll.(1979), soit $4 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. Dernière constante à déterminer mais non la moindre: le coefficient de diffusion du complexe dans la membrane. En se basant sur les constantes de vitesse de translocation de la nonactine fournies dans la littérature (Hladky, 1975; Hladky, 1979), nous avons estimé le coefficient de diffusion à $1 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ³⁷. Schoch & coll. utilisèrent quant à eux une valeur de $0,9 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Si nous utilisons l'ensemble de ces valeurs pour calculer la constante K pour la bicouche 881106B, nous arrivons à $K = 17,1 \text{ } \mu\text{A}$. Nous n'avons pas ici la prétention d'affirmer que K vaut précisément $17,1 \text{ } \mu\text{A}$. Les valeurs de d , γ_{is} , K_{A}^{W} sont précises à 20% près environ alors que le coefficient D est connu à un ordre de grandeur près seulement. Mais puisque les incertitudes des données tirées de la littérature ne sont pas fournies, nous garderons, pour les besoins du calcul, cette valeur de $17,1 \text{ } \mu\text{A}$.

Après l'addition de nonactine, quatre courbes I-V furent prises, toutes sous agitation (environ 200 révolutions par minute). La courbe I-V traitée est la troisième (I-V #881106B3). Elle fut prise entre la 91^e et la 92^e minute suivant la formation de la bicouche. La rampe de tension alors appliquée fut une onde triangulaire de 210 mV d'amplitude et de fréquence égale à 10 mHz. Dix mille (10 000) points furent acquisitionnés à une fréquence de 200 Hz. L'acquisition dura donc 100 s, soit la durée d'un cycle I-V complet. Les points furent moyennés par groupe de dix et les mille (1000) points restants furent conservés sur disquette.

³⁶ Énergie libre de transfert, énergie neutre, énergie libre de partage sont des synonymes, malheureusement indicatifs du morcellement des spécialisations disciplinaires.

³⁷ La formule utilisée est $D = 0,25 \cdot \pi d^2 k_{\text{is}}$ (équation 2.75), avec $d = 3,0 \text{ nm}$ et $k_{\text{is}} = 20\,000 \text{ s}^{-1}$.

Ces mille points furent traités par le programme TPZIV apparaissant à l'annexe 3. En utilisant une valeur de K de $17,1 \mu\text{A}$, nous obtenons les résultats suivants: $\psi_1 = 233,0 \text{ mV}$, $\Delta\psi_d = +78,1 \text{ mV}$, $n_1 = 0,25$ et $n_2 = 0,73$. Ces paramètres forment l'ensemble optimal, ce sont ceux qui minimisent la somme des carrés des écarts. La racine carrée de cette somme divisée par 1000 donne $0,346 \text{ nA}$ ($\tau_{\min} = 0,346 \text{ nA}$). Trois constatations s'imposent: i) il est possible de déterminer quatre paramètres à partir de la courbe I-V, ii) τ_{\min} étant inférieur à 0,7% de la moyenne de la valeur absolue des courants mesurés à -210 mV et à $+210 \text{ mV}$, l'approximation de la courbe I-V expérimentale par l'équation 2.35 est excellente, et iii) la position des coins de la barrière de potentiel trapézoïdale est quasi-symétrique ($n_1 + n_2 = 0,98$).

Nous avons ensuite analysé si la qualité et les paramètres du "lissage" dépendaient du nombre de points traités. Les résultats montrent qu'entre 60 et 1000 points, les valeurs des paramètres déterminés ne varient pas et le τ_{\min} demeure égal à $0,346 \text{ nA}$. Les courbes traitées montrant toutes un niveau de bruit comparable à la courbe 881106B3, nous pourrions donc par la suite utiliser un plus petit nombre de points afin d'accélérer le processus de recherche de la combinaison optimale. Il s'agira dans une dernière étape de prendre le maximum de points disponibles et de faire varier les paramètres à proximité des valeurs déterminées avec un plus petit nombre de points. Pour une courbe de 1000 points, nous pouvons réduire ainsi le temps de calcul par un facteur dix.

La position des coins étant quasi symétrique, nous avons extrait de nouveau les paramètres de la barrière mais cette fois en ajoutant la contrainte $n_1 + n_2 = 1$. Les paramètres obtenus furent les suivants: $\psi_1 = 236,5 \text{ mV}$, $\Delta\psi_d = +65,6 \text{ mV}$, et $n_1 = 0,26$, avec un écart-type de $0,346 \text{ nA}$. La courbe expérimentale et la courbe "lissée" apparaissent à la **figure 5.12**.

Les deux courbes sont tellement semblables que nous avons dû agrandir l'échelle d'un facteur 15 pour en visualiser l'écart. Les deux branches que nous voyons sur le graphique en inséré correspondent aux deux demi-cycles de la courbe I-V. La courbe I-V simulée passe entre la branche du haut (tensions descendantes) et la branche inférieure (tensions descendantes). Si ce n'était de l'effet d'hystérèse, bien manifeste à $+200 \text{ mV}$, l'écart moyen serait encore plus faible. La modélisation selon l'approche de Nernst-Planck est des plus satisfaisantes.

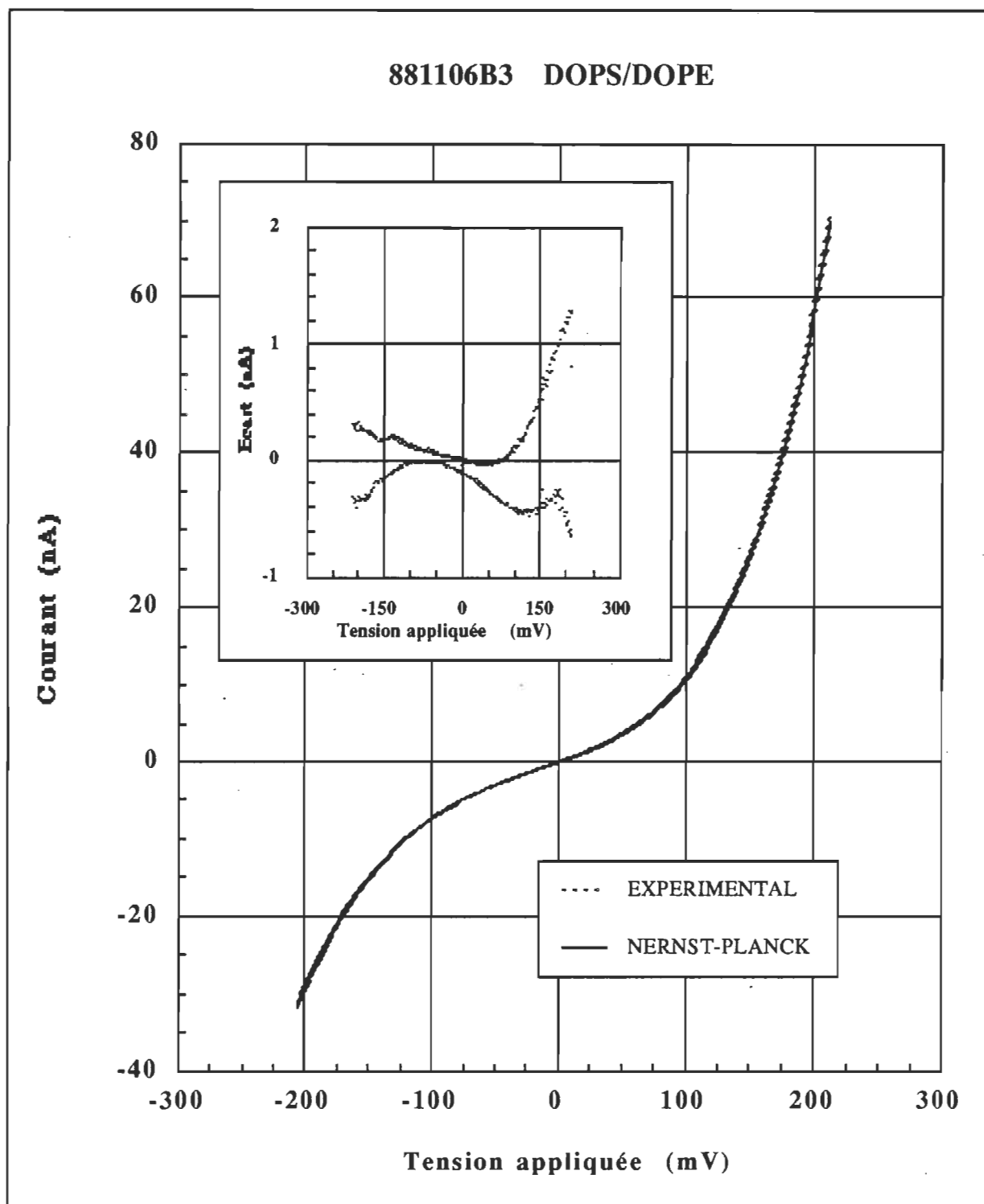


Figure 5.12. – Courbe I-V expérimentale approximée à l'aide de l'expression 2.35 (approche de Nernst-Planck) avec $n_1 = 1 - n_2$. Les caractéristiques de la barrière trapézoïdale simulée sont données dans le texte. Nombre de points: 500. Inséré: Ecart entre le courant prédit par le modèle et le courant mesuré expérimentalement. Phase aqueuses: KCl 10/10 mM, nonactine 500/510 nM.

Nous avons ensuite évalué l'effet de la constante K sur la barrière trapézoïdale extraite de la courbe I - V à l'étude. Pour une valeur de K de $1,71 \mu A$ (dix fois inférieure à la valeur standard), nous extrayons les paramètres qui suivent: $\psi_1 = 176 \text{ mV}$, $\Delta\psi_d = +67 \text{ mV}$, et $n_1 = 0,26$, avec un écart-type de $0,34 \text{ nA}$. Si nous prenons une valeur dix fois supérieure ($K=171 \mu A$): $\psi_1 = 297 \text{ mV}$, $\Delta\psi_d = +67 \text{ mV}$, et $n_1 = 0,26$, avec un écart-type de $0,33 \text{ nA}$. Ces résultats sont très intéressants. Ils démontrent, d'une part, que la valeur de K n'affecte pas les paramètres $\Delta\psi_d$ et n_1 , et d'autre part qu'il existe bel et bien un lien entre ψ_1 et K . Nous prévoyions à la section 2.3.3.4 une augmentation de 59 mV ($T = 23^\circ C$) de ψ_1 si l'on prend une valeur K dix fois plus élevée. Nos simulations donnent 60 mV . Si nous calculons pour les trois "expériences" le potentiel global ϕ_1^* (équation 2.62), nous obtenons des valeurs de $20,2$, $20,2$ et $20,3$ (avec la constante K exprimée en A). Le profil de la barrière de potentiel global serait donc donné par $\phi_1^* = 20,2$, $\phi_2^* = 21,5$, $n_1 = 0,26$ et $n_2 = 0,74$ (avec $n_2 = 1-n_1$). Si nous voulons connaître avec précision le potentiel intrinsèque ψ , il nous faut connaître avec précision K . Dans le cas qui nous préoccupe, il serait prudent d'affirmer que le potentiel au coin du côté cis, ψ_1 , se situe entre $+150$ et $+330 \text{ mV}$.

Évaluons maintenant l'incertitude sur chacun des paramètres de la barrière. Pour ce, examinons d'abord l'espace-solution en fonction des différents paramètres. Supposons que la valeur de K est connue avec précision et qu'elle est égale à $17,1 \mu A$. Faisons maintenant varier un des trois paramètres restants, disons ψ_1 , en gardant les deux autres égaux à leur valeur donnée par la combinaison optimale, (ici $\Delta\psi_d = +65,6 \text{ mV}$ et $n_1 = 0,26$). Mettons en graphique l'écart τ en fonction de ψ_1 . La courbe devrait montrer évidemment un minimum à la valeur "optimale" du paramètre, soit à $236,5 \text{ mV}$. Le même exercice avec $\Delta\psi_d$, nous donnerait un minimum à $\Delta\psi_d = +65,6 \text{ mV}$ et à $0,26$ pour n_1 . Afin de comparer la sensibilité du lissage aux différents paramètres (donnée par la pente de τ en fonction du paramètre à l'étude), nous avons exprimé ceux-ci en pourcentage de leur valeur optimale (nous entendons ici leur valeur donnée dans la combinaison fournissant le τ minimum). Les trois courbes sont présentées à la **figure 5.13**. Nous voyons une nette différence entre le comportement de τ en fonction des trois paramètres. La pente de τ en fonction de ψ_1 est environ 7 fois plus abrupte que celle en fonction de n_1 et environ 20 fois celle en fonction de $\Delta\psi_d$. Les paramètres les plus faciles à extraire de la courbe I - V sont donc dans l'ordre ψ_1 , n_1 et $\Delta\psi_d$.

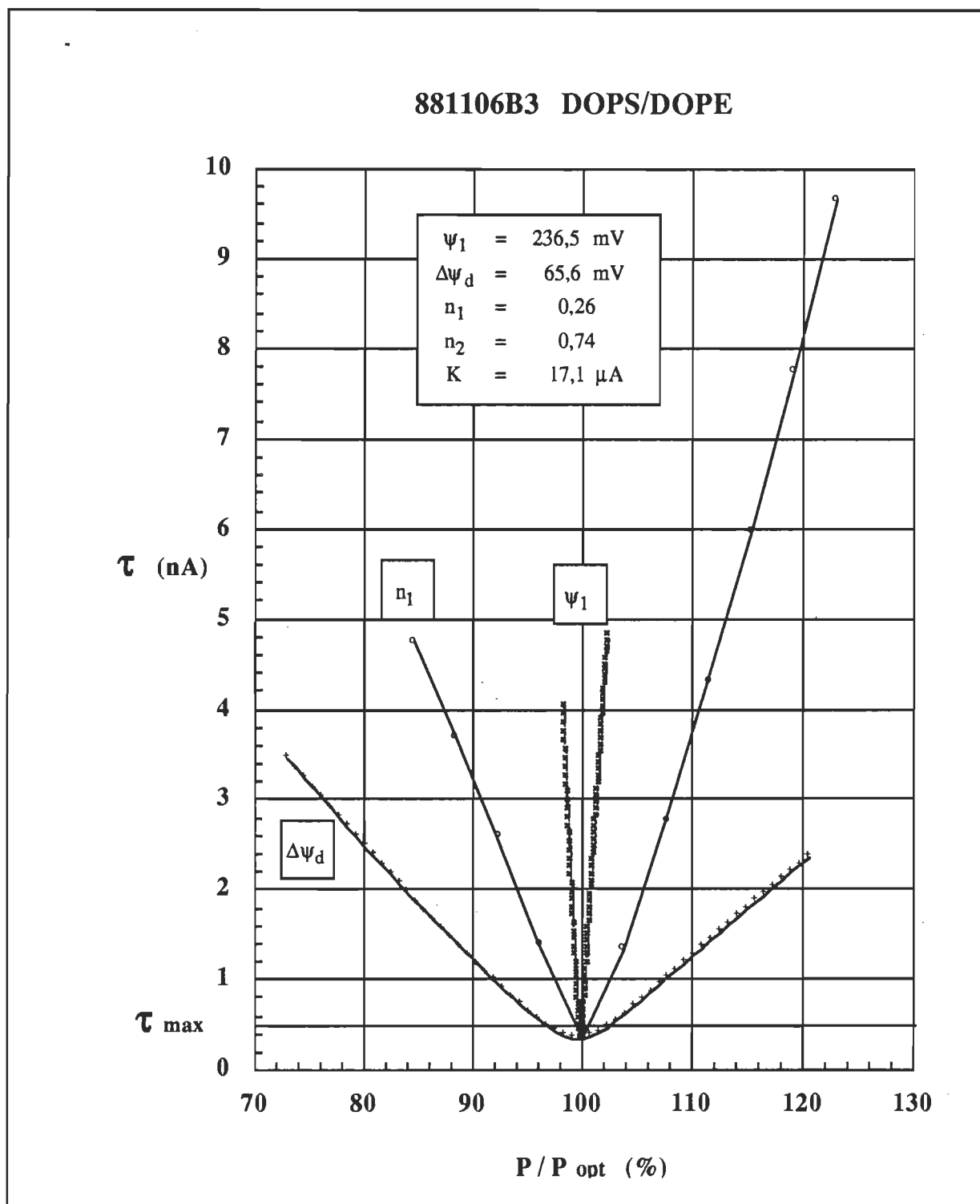


Figure 5.13. – Graphique de l'écart-type τ en fonction des paramètres normalisés P/P_{opt} . Les paramètres "optimaux" de la barrière sont fournis dans l'encart. Les écarts-type τ_{min} et τ_{max} sont respectivement de 0,35 nA et 0,50 nA. Les points sont reliés suite à une interpolation dite "spline". Dans tous les cas, $n_1+n_2=1$.

Nous avons tracé dans le bas de la figure 5.13 une ligne à 0,5 nA. Cette valeur nous semble un juste estimé de l'erreur expérimentale moyenne des points de la courbe I-V. Si nous examinons l'endroit où cette ligne coupe les trois courbes, nous aurons une idée de l'incertitude relative sur les valeurs "optimales" de ψ_1 , n_1 et $\Delta\psi_d$. En termes d'incertitudes absolues, nous obtenons: $\psi_1 = 236,5 \pm 0,5$ mV, $\Delta\psi_d = +65,5 \pm 2,5$ mV et $n_1 = 0,260 \pm 0,005$ mV. En fait, ces incertitudes sont des incertitudes minimales. Une estimation correcte nécessiterait une image en quatre dimensions de l'espace-solution. Mais puisque le programme TPZIV permet de faire varier tous les paramètres à la fois, il nous suffit de faire une liste de toutes les combinaisons dont le τ est inférieur à 0,5 nA et de regarder l'étendue des valeurs pour chaque paramètre. Des valeurs plus réalistes sont obtenues: $\psi_1 = 237 \pm 3$ mV, $\Delta\psi_d = +68 \pm 8$ mV et $n_1 = 0,27 \pm 0,02$. Si nous relaxons la contrainte $n_1 + n_2 = 1$, nous obtenons des valeurs similaires sauf que les incertitudes sont beaucoup plus grandes: de l'ordre d'un facteur deux pour ψ_1 et n_1 , et d'un facteur trois environ pour $\Delta\psi_d$.

À titre de curiosité, regardons maintenant ce qu'il serait advenu si nous avions utilisé la formulation approchée de Schoch & coll. (équation 2.37) plutôt que la formulation exacte (équation 2.35). La figure 5.14 nous montre les courbes I-V prédites par les deux expressions avec $\psi_1 = 236,5$ mV, $\Delta\psi_d = +65,6$ mV, $n_1 = 0,26$, $n_2 = 0,74$ et $K = 17,1$ μ A. Les deux courbes s'écartent l'une de l'autre à partir de 100 mV. Cela ne serait pas inquiétant si l'écart se creusait pareillement dans les deux extrémités. Il nous suffirait alors de corriger la valeur de ϕ_1^* dans le cas du profil déterminé avec la formule approchée et le tour serait joué. Mais ce n'est pas le cas. La figure 5.15, donnant le rapport de rectification pour les deux expressions, est très claire à cet égard. La formulation exacte prédit des rapports de rectification plus élevés que ceux de la formule approchée. Non seulement l'amplitude du courant est modifiée (paramètre ϕ^*) mais la forme aussi ($\Delta\psi_d$, Δn).

Si nous traitons à partir du programme TPZIV la courbe I-V prédite par l'expression tronquée, nous obtenons un nouveau profil de barrière: $\psi_1 = 238,5$ mV, $\Delta\psi_d = +75$ mV, $n_1 = 0,30$, $n_2 = 1 - n_1 = 0,70$ ($\tau = 0,215$ nA). Le paramètre le plus affecté suite à la troncation de l'expression est Δn , et par ricochet, $\Delta\psi_d$. En définitive, les barrières extraites en utilisant l'expression approchée montrent une section centrale dont la largeur est surévaluée (ici de l'ordre de 25%) et partant de là les valeurs de $\Delta\psi_d$ par la formule tronquée sont sous-estimées (d'environ 15% ici). Ce résultat est d'un intérêt certain puisque toutes les données apparaissant dans la littérature furent extraites à partir de la formule tronquée.

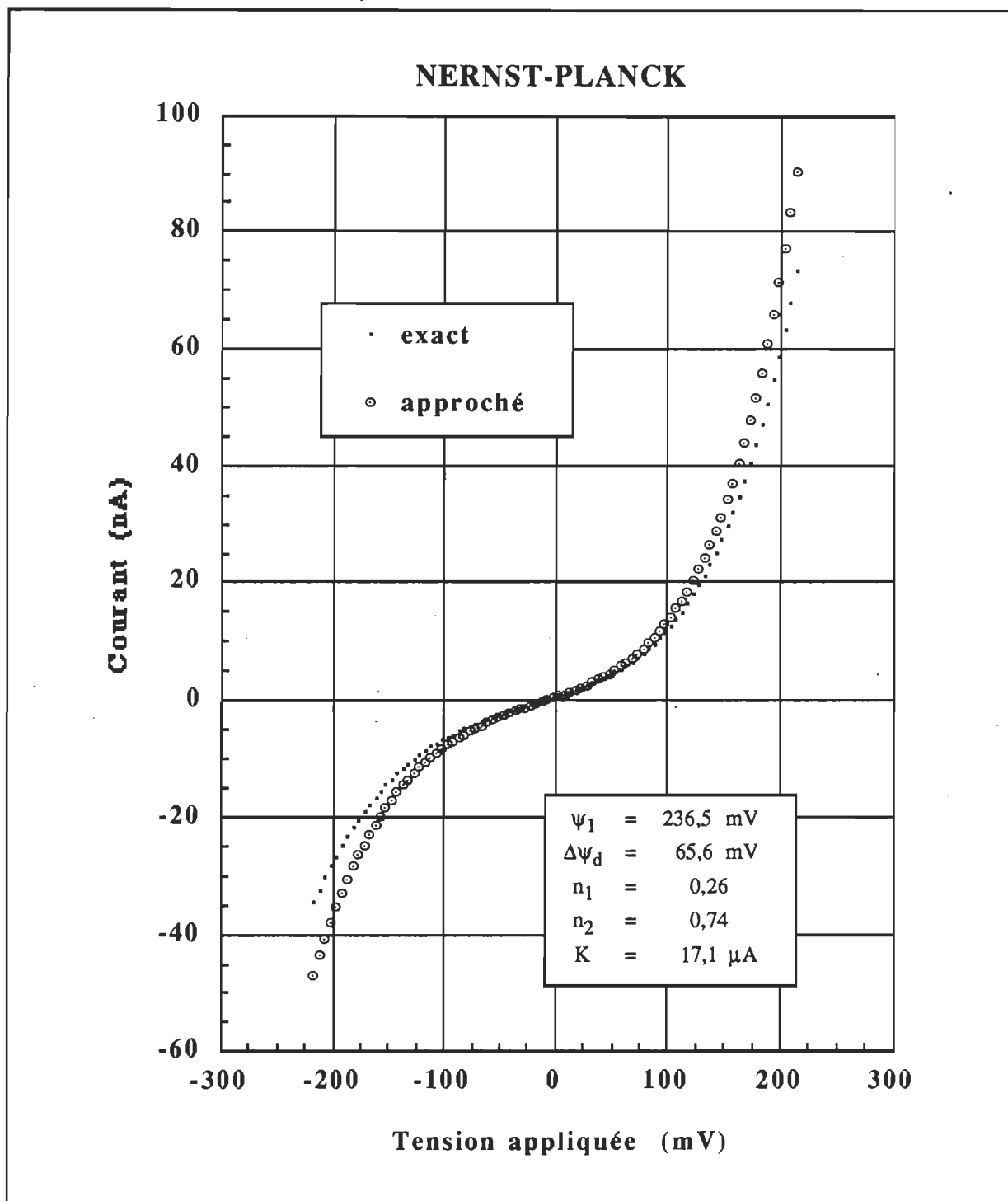


Figure 5.14. – Comparaison des courbes I-V prédites par les expressions exacte (éq. 2.35) et approchée (éq. 2.37) de la théorie de Nernst-Planck. Le courant prédit par l'équation exacte (intégration de la barrière entre $x = 0$ et $x = d$) est inférieur à celui prédit par la formule tronquée (intégration entre $x = N_1$ et $x = N_2$). Les paramètres donnés dans l'inséré correspondent à la barrière trapézoïdale approximant le mieux la courbe I-V #881106B3.

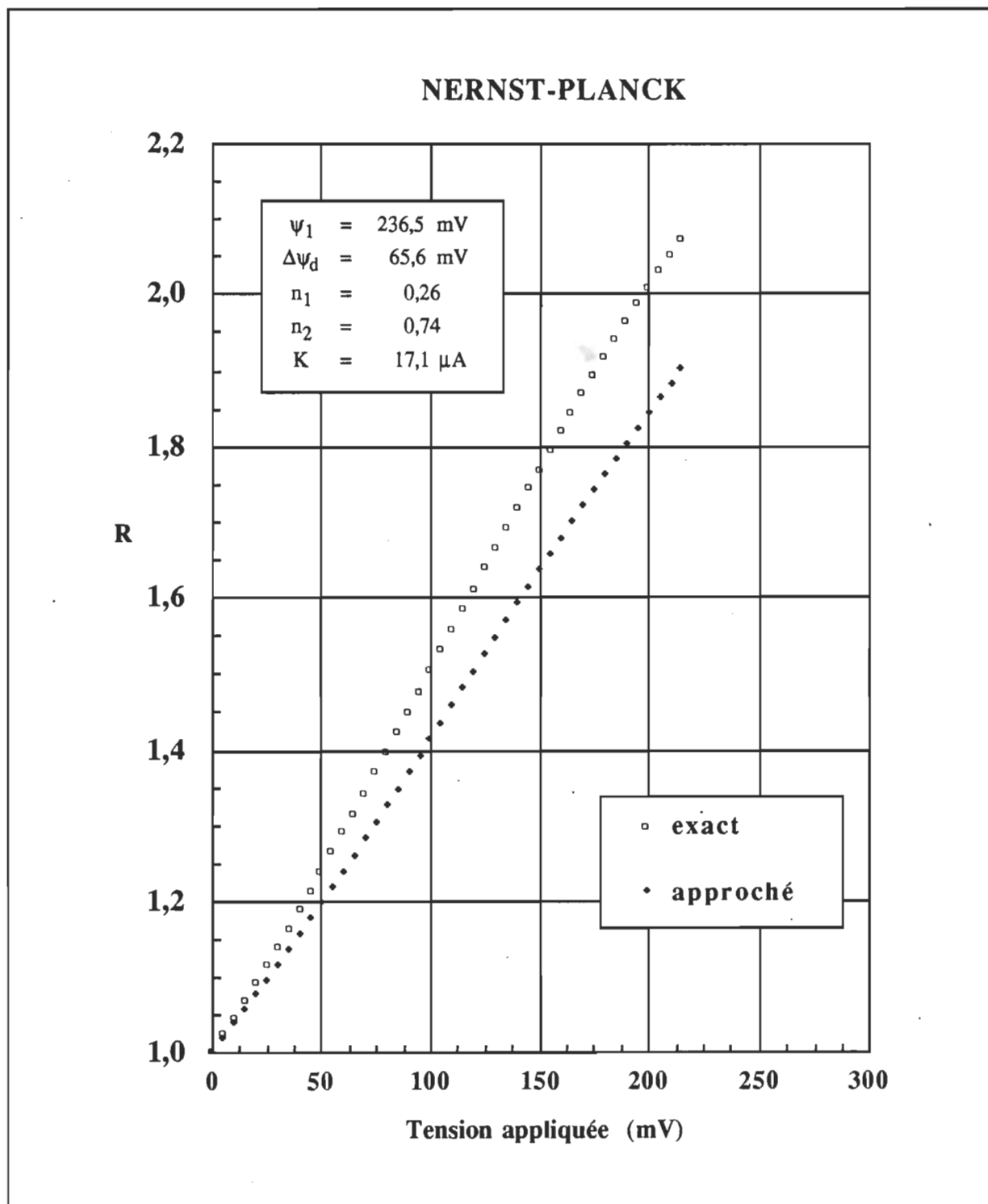


Figure 5.15. – Graphique de R en fonction de V illustrant l'effet de ne considérer que la partie centrale de la barrière trapézoïdale (courbe #881106B3). Les courbes lissées de la figure 5.14 coupant l'axe des tensions à +1,3 mV, elles furent décalées toutes deux de 1,3 mV vers la gauche avant de procéder au calcul de R . Aucune discontinuité n'est notée vers +65 mV.

5.6.2 Ensemble des barrières de potentiel caractérisées

Quinze barrières de potentiels furent extraites de quinze courbes I-V. Chacune de ces courbes provient d'une bicouche dopée à la nonactine différente. Trois barrières furent extraites à partir de trois courbes I-V reproduites dans la littérature, chacune provenant d'une bicouche particulière. Ces courbes sont tirées des articles de Hall & Latorre (1976), de Latorre & Hall (1978) et de Schoch & coll. (1979). Parmi les quinze courbes traitées, une seule était symétrique. Il s'agit de la courbe 871129A2 obtenue d'une bicouche symétrique de DOPE.

Deux séries de régressions combinatoires furent effectuées, l'une en faisant varier de manière indépendante les paramètres ψ_1 , $\Delta\psi_d$, n_1 et n_2 et l'autre avec la contrainte $n_1 + n_2 = 1$. Dans chacun des cas nous avons posé $\gamma_{is} = 5000$, $K_A^W = 4 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, $D = 1 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $d = 3,0 \text{ nm}$. Nous n'excluons pas la possibilité que ces valeurs varient d'une bicouche à l'autre - étant donné la variabilité des bicouches Montal-Mueller le contraire serait étonnant - mais nous faisons l'hypothèse qu'elles ne varient pas au point d'affecter les profils convoités. D'ailleurs, toutes les bicouches à l'étude sont formées à partir de films de phospholipides purs (constitution similaire donc) et douze d'entre elles (celles provenant de notre étude) possèdent des chaînes hydrocarbonées identiques (intérieur hydrocarboné identique).

Nous présentons au **tableau 7** les valeurs de n_1 et n_2 extraites des quinze courbes I-V en faisant varier de manière indépendante les quatre paramètres ψ_1 , $\Delta\psi_d$, n_1 et n_2 .

Tableau 7
Valeurs de n_1 et n_2 avec quatre paramètres variables ($n_2 \neq 1 - n_1$)

Courbe I-V #	Lipides	n_1	n_2	$n_1 + n_2$
861206J5	DOPE/DOPS	$0,23 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,07$
871129A2	DOPE/DOPE	$0,27 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,07$
880629B5	DOPG/DOPE	$0,28 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,06$
880629D3	DOPG/DOPE	$0,25 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,07$
880630A6	DOPS/DOPE	$0,28 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,05$
880720A3	DOPE/DOPG	$0,24 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,12$
880722A5	DOPE/DOPG	$0,26 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,07$
880816A3	DOPE/DOPG	$0,22 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,05$
880826B3	DOPE/DOPG	$0,25 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,05$
881104D2	DOPE/DOPS	$0,24 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,03$	$1,02 \pm 0,05$
881106A5	DOPE/DOPS	$0,25 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,05$
881106B3	DOPS/DOPE	$0,25 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,05$
Hall & Latorre, 1976	PE/PS	$0,29 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,07$
Latorre & Hall, 1978	PE/PS	$0,28 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,05$
Schoch & coll., 1979	PS/PS ^o	$0,15 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,09$

Les valeurs de n_1 présentées au tableau 7 se baladent entre 0,23 et 0,29 avec une valeur singulière à 0,15 (Schoch & coll.). Nous reviendrons sur cette valeur plus loin. Prenons une valeur moyenne de 0,25. Si nous multiplions cette valeur par l'épaisseur de la barrière d (prise égale à 3,00 nm), nous obtenons une distance de 0,75 nm, soit environ la distance entre 4 atomes de carbone constituant la chaîne hydrocarbonée (Lewis & Engelman, 1983). Cette valeur n'est donnée qu'à titre indicatif. Elle peut être plus grande ou plus petite dépendamment de l'épaisseur de la barrière. Rappelons que nous n'avons pas accès à cette valeur de d sinon qu'au travers de la constante K . Mais puisque K ne peut être dissociée du potentiel ϕ_1^* et que nous ne connaissons pas ϕ_1 , la valeur de d demeure indéterminée.

La dernière colonne de tableau donne la somme de n_1 et n_2 . Il est remarquable de constater que toutes les valeurs tournent autour de l'unité. Cela indique que la distance sur laquelle le potentiel grimpe est la même de chaque côté de la bicouche ($N_1 = d - N_2$). Ces bicouches asymétriques montrent donc une symétrie structurale. L'organisation spatiale de la distribution de charge n'est donc pas parfaitement asymétrique. Ce résultat constitue une des premières indications expérimentales de cette symétrie d'organisation. Voilà donc un acquis important apporté par le présent travail.

Conséquence pratique de ce résultat, nous pouvons utiliser la contrainte $n_2 = 1 - n_1$ et ainsi déterminer avec plus de précision (et plus rapidement !) les valeurs de ψ_1 , $\Delta\psi_d$ et n_1 . Ces valeurs sont répertoriées au **tableau 8**.

Tableau 8
Barrières trapézoïdales extraites des 15 courbes I-V (avec $n_2 = 1 - n_1$)

Courbe I-V #	Lipides	I mM	ψ_1 mV	$\Delta\psi$ mV	n_1 -	$\Delta\psi_d$ mV	τ_{\min} %
-	-	-	-	-	-	-	-
871129A2	DOPE/DOPE	100	344 ± 4	-3 ± 2	$0,27 \pm 0,02$	-8 ± 3	0,37%
880816A3	DOPE/DOPG	10	197 ± 3	-31 ± 2	$0,22 \pm 0,02$	-55 ± 6	0,41%
880629B5	DOPG/DOPE	10	235 ± 2	78 ± 2	$0,30 \pm 0,02$	202 ± 30	0,50%
880720A3	DOPE/DOPG	100	226 ± 3	-47 ± 3	$0,23 \pm 0,02$	-87 ± 10	0,50%
880722A5	DOPE/DOPG	100	300 ± 4	-90 ± 5	$0,26 \pm 0,02$	-190 ± 20	0,47%
880826B3	DOPE/DOPG	100	303 ± 4	-51 ± 3	$0,26 \pm 0,02$	-105 ± 11	0,40%
880629D3	DOPG/DOPE	100	234 ± 1	80 ± 2	$0,29 \pm 0,01$	189 ± 18	0,49%
881106A5	DOPE/DOPS	10	301 ± 4	-41 ± 3	$0,25 \pm 0,03$	-85 ± 15	0,58%
881106B3	DOPS/DOPE	10	237 ± 3	32 ± 2	$0,27 \pm 0,02$	68 ± 8	0,68%
861206J5	DOPE/DOPS	100	361 ± 3	-60 ± 3	$0,23 \pm 0,02$	-113 ± 10	0,56%
881104D2	DOPE/DOPS	100	284 ± 3	-61 ± 2	$0,23 \pm 0,02$	-113 ± 8	0,69%
880630A6	DOPS/DOPE	100	270 ± 2	43 ± 3	$0,29 \pm 0,02$	105 ± 13	0,77%
Hall 1976	PE/PS	50	422 ± 3	-62 ± 4	$0,29 \pm 0,02$	-153 ± 15	0,89%
Latorre 1978	PE/PS	10	369 ± 5	-122 ± 14	$0,31 \pm 0,02$	-320 ± 55	0,61%
Schoch 1979	PS/PS ^o	10	261 ± 2	63 ± 3	$0,17 \pm 0,01$	96 ± 6	0,55%

I représente la force ionique des phases aqueuses. τ_{\min} est l'écart-type exprimé en pourcentage du courant maximal moyen ($= [I(V_{\max}) - I(V_{\min})] \cdot 0,5$). Les paramètres de la barrière sont donnés sous la forme $a \pm b$, où a représente la valeur centrale du paramètre et b la demie de l'étendue ($\tau < \tau_{\max} < 1\%$). La concentration de nonactine dans la phase aqueuse varie de 50 nM (861206J5) à 1000 nM (Latorre 1978).

Mentionnons en premier lieu que l'approximation de la barrière trapézoïdale selon Nernst-Planck rend compte des quinze courbes I-V à l'étude. La dernière colonne du tableau en témoigne éloquentement. L'écart-type moyen est de 0,56% ce qui est encore mieux que l'exemple donnée à la section précédente ($\tau_{\min} = 0,68\%$). En prenant un τ_{\max} égal à 1% (ce qui correspond grosso modo à l'incertitude sur la mesure), l'incertitude moyenne sur les paramètres ψ_1 , $\Delta\psi$, n_1 et $\Delta\psi_d$ est de 1, 5, 7 et 11% respectivement. La technique permet donc une caractérisation précise de la barrière de potentiel.

Les profils de barrière tirés des différentes courbes I-V montrent des variations excédant de beaucoup ces incertitudes relatives. Ainsi nous mesurons sur l'ensemble des données des valeurs de ψ_1 variant de 197 à 422 mV, mais puisque la barrière à la position N_1 est parfois plus petite, parfois plus élevée qu'à la position N_2 (asymétrie positive ou négative), il serait plus juste d'examiner la hauteur moyenne du potentiel entre les deux coins. Ce nouveau paramètre, dénoté $\bar{\psi}$, est donné à l'équation 5.3 :

$$\bar{\psi} \equiv \frac{\psi_1 + \psi_2}{2} \quad [5.3]$$

Les calculs effectués nous arrivons à une valeur centrale de 290 mV avec une étendue de 210 mV (légèrement plus faible que celle de ψ_1). En unités kT, cela correspond à une barrière d'énergie de 11 kT en moyenne, avec des extrêmes à 7 et 15 kT. Ces écarts s'expliquent en partie par le fait que les bicouches apparaissant dans le tableau ont une composition différente.

Mais même pour des bicouches de même composition à une même force ionique nous notons des écarts appréciables. Pour des bicouches de DOPE et de DOPG à 100 mM, nous notons des hauteurs moyennes de barrière de 278, 255, 203 et 274 mV. L'étendue de ce petit groupe est de 75 mV. Pour des bicouches DOPE//DOPS ³⁸ à la même force ionique, nous obtenons une étendue de 78 mV (trois valeurs). Les valeurs moyennes dans les deux cas sont de 250 mV (DOPE//DOPG) et 290 mV (DOPE//DOPS). Si nous supposons que la constante K peut être dix fois plus petite ou dix fois plus grande que la valeur standard, les potentiels peuvent être surévalués ou sous-évalués de 60 mV environ. Si nous sommions les deux étendues, nous aurons comme hauteur de barrière moyenne 250 ± 140 mV (10 ± 6 kT) dans le cas de bicouches formées de DOPE et DOPG et 290 ± 140 mV (11 ± 6 kT) pour les bicouches asymétriques DOPE et DOPS ³⁹. Il est à noter que cette barrière inclut la contribution du champ créé par $\Delta\psi_{DC}$. Si nous prenons la valeur moyenne des $\Delta\psi_d$ pour les deux types de bicouches dont il est question et que nous la posons égale à $\Delta\psi_{DC}$, nous pouvons calculer de nouvelles hauteurs de barrière n'incluant pas l'effet des doubles couches électriques. Pour les bicouches de DOPE et DOPG nous obtenons: 285 mV (11,1 kT); et pour celles formées de DOPE et de DOPS: 320 mV (12,5 kT).

³⁸ Le symbole // indique que le sens de l'asymétrie de composition n'est pas considéré.

³⁹ La valeur de 140 mV représente ici aussi la demie de l'étendue et non pas l'écart-type.

Flewelling & Hubbell (1986b) et Andersen & Fuchs (1975) ont calculé théoriquement la barrière d'énergie totale que rencontre un ion liposoluble de 0,42 nm de rayon. La hauteur maximale de la barrière serait de l'ordre de 25-30 kT. Sachant i) que l'énergie de Born contribue substantiellement à la barrière d'énergie totale (Flewelling & Hubbell, 1986b), ii) que l'énergie de Born varie comme l'inverse du rayon ionique (voir équation 2.18) et iii) que le complexe nonactine- K^+ possède un rayon plus important ($r_i = 0,63$ nm) que l'ion liposoluble étudié par ces auteurs, il est clair que la barrière de potentiel que rencontre notre sonde de potentiel lors de sa translocation au travers de la membrane est inférieure à 30 kT. Les valeurs obtenues semblent donc tout à fait plausibles physiquement.

Passons maintenant au paramètre dont l'intérêt biophysique est le plus immédiat, $\Delta\psi_d$. Si l'on oublie la valeur de -8 mV provenant de la bicouche symétrique, les valeurs de $\Delta\psi_d$ présentées au tableau 8 varient entre -320 mV et 202 mV. Les valeurs positives de $\Delta\psi_d$ sont tirées de courbes I-V de bicouches du type lipide anionique/lipide zwitterionique alors que les valeurs négatives proviennent de bicouches du type inverse. Qualitativement, ces résultats sont cohérents mais qu'en est-il sur un plan plus quantitatif ? Mesurons-nous vraiment une différence de potentiel transmembranaire de -320 mV (ligne 14) ? $\Delta\psi_d$ varierait-il d'un facteur quatre d'une bicouche de même composition à l'autre (lignes 2 et 3 du tableau 8) ?

5.6.3 Étude de la fiabilité du procédé d'extraction de la barrière de potentiel

La différence de hauteur entre les coins du trapèze, qu'elle soit ramenée sur toute l'épaisseur de la barrière ($\Delta\psi_d$) ou non ($\Delta\psi$), est le paramètre influençant le plus fortement l'asymétrie de la courbe. Cette asymétrie peut être caractérisée à l'aide de facteurs tels le rapport de rectification R ou le paramètre A que nous avons définis au chapitre II. Si nous pouvons établir une corrélation nette entre un paramètre d'asymétrie, tiré directement de la courbe I-V, et un paramètre d'asymétrie caractérisant la barrière de potentiel, nous ferons alors la preuve que notre méthodologie est correcte... et les résultats présentés au tableau 8 seront alors marqués d'un sceau de qualité.

Le paramètre d'asymétrie couramment utilisé dans le domaine est le rapport de rectification, R, défini à l'équation 2.39. Nous pouvons soit le mesurer directement sur le

papier à l'aide d'une règle ou, lorsque nous disposons des données numériques, le calculer directement. Certaines courbes ne dépassant pas les 160 mV d'amplitude, nous avons choisi de calculer le rapport de rectification à une tension de 150 mV. Ce rapport est noté $R(150)$. Nous retrouvons au **tableau 9** les valeurs de $R(150)$ et de $\Delta\psi_d$ pour chacune des courbes traitées. Les points sont portés en graphique à la **figure 5.16**. D'après l'allure des points représentés (et compte tenu aussi de la forme des équations), une régression exponentielle fut effectuée. Les points suivent assez bien la courbe (coefficient de corrélation = 0,908), sauf un (la courbe I-V tirée de l'article de Schoch & coll.). En fait nous ne pouvions nous attendre à une corrélation parfaite puisque le rapport de rectification R ne dépend pas seulement de $\Delta\psi_d$ mais aussi des paramètres γ , Δn , et à un moindre degré, de ψ_1 et n_1 .

Nous avons défini à la page 114 un paramètre d'asymétrie, noté A , qui ne dépend pas de γ . Le rapport des concentrations n'étant pas identique d'une bicouche à l'autre, nous sommes en droit d'espérer que les paramètres A et $\Delta\psi_d$ montrent une corrélation plus étroite encore. Eh bien, nous aurions tort ! Si nous portons en graphique A à 150 mV et $|\Delta\psi_d|$ (**figure 5.17**) , nous obtenons, toujours pour une dépendance exponentielle, un coefficient de corrélation de 0,582 seulement. Des régressions polynomiales (jusqu'à l'ordre 4) ne permettent pas d'améliorer ce coefficient.

Tableau 9
Rapport entre les paramètres d'asymétrie et les mesures de $\Delta\psi_d$

Courbe I-V #	γ	$R(150)$	$\Delta\psi$ mV	$\Delta\psi_d$ mV	$A(150)$	$A^*(150)$
—	—	—	—	—	—	—
Latorre 1978	1,00	0,24	-122	-320	4,26	3,81
880722A5	0,88	0,27	-90	-190	4,22	3,07
881104D2	0,88	0,36	-61	-113	3,14	2,12
861206J5	0,89	0,36	-60	-113	3,12	2,11
Hall 1976	1,00	0,38	-62	-153	2,65	2,32
880826B3	0,90	0,43	-51	-105	2,61	2,04
880720A3	0,89	0,46	-47	-87	2,47	1,67
881106A5	0,86	0,47	-41	-85	2,47	1,81
880816A3	0,89	0,54	-31	-55	2,09	1,32
871129A2	0,88	1,04	-3	-8	1,09	0,19
881106B3	1,02	1,75	32	68	1,79	1,26
880630A6	0,84	2,28	43	105	1,92	1,58
880629B5	0,89	3,48	78	205	3,10	2,90
Schoch 1979	1,00	3,70	63	96	3,70	1,98
880629D3	0,89	3,73	80	189	3,32	2,86

Les paramètres A et A^* sont calculés à l'aide des expressions 2.46 et 5.4.

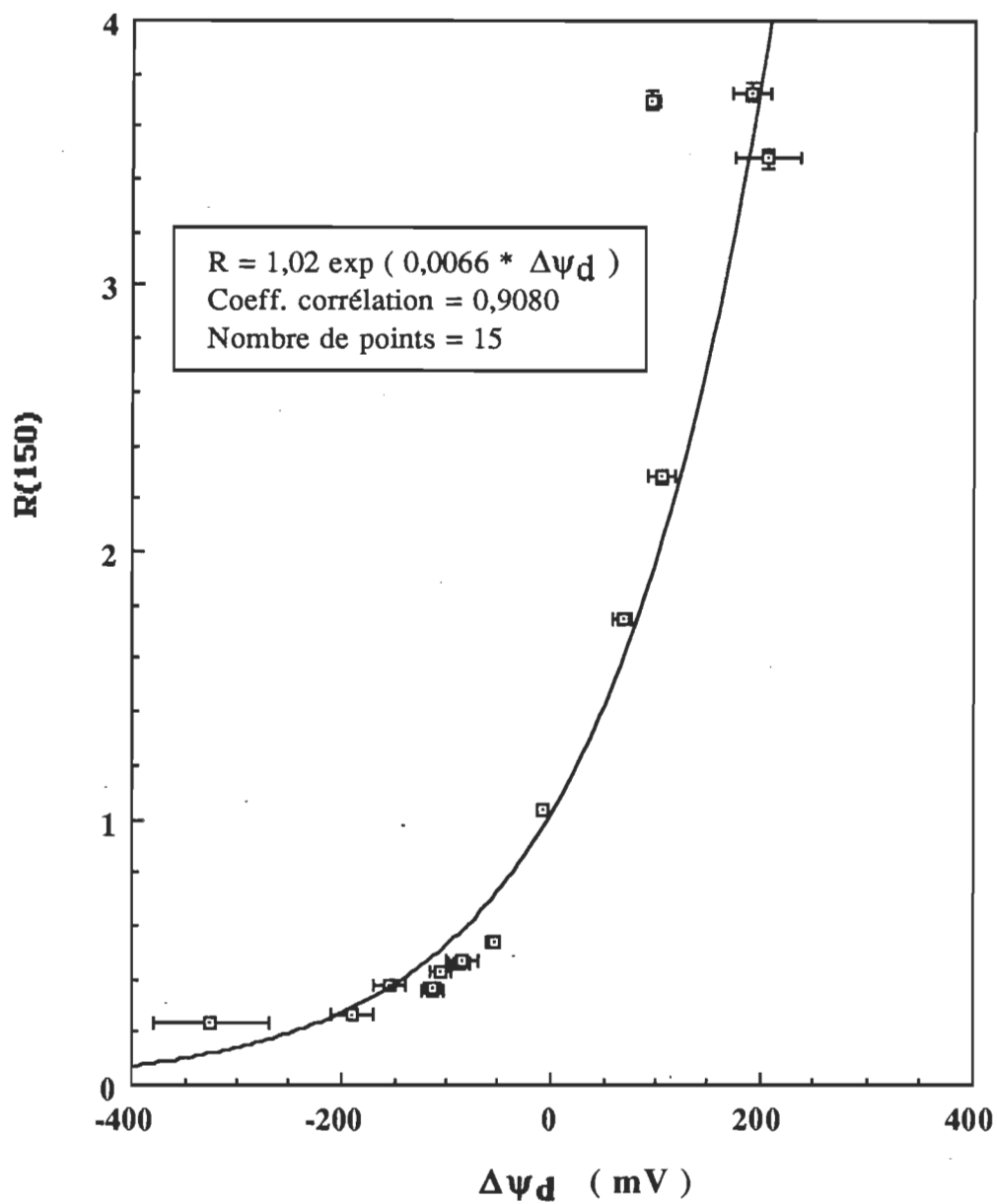


Figure 5.16. – Graphique du rapport de rectification R pris à +150 mV en fonction des valeurs de $\Delta\psi_d$ extraites des courbes I-V. (Les données numériques apparaissent au tableau 9).

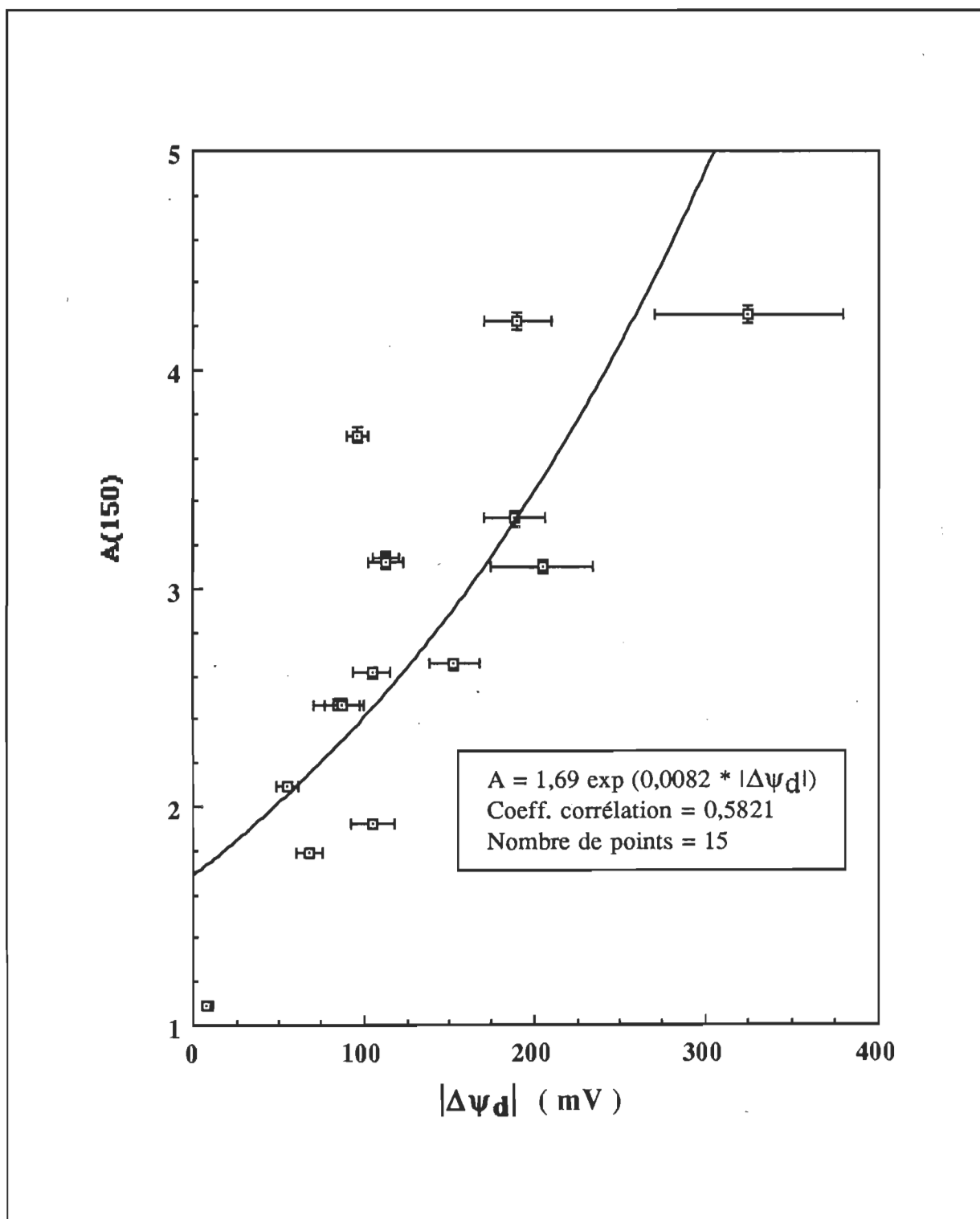


Figure 5.17.— Graphique du paramètre d'asymétrie A à +150 mV en fonction de $|\Delta\psi_d|$. (Les données numériques apparaissent au tableau 9).

En corrigeant R via le paramètre A, nous nous sommes éloignés du but recherché. Plus que jamais, nous sommes en droit de douter de notre méthodologie. Mais ne nous arrêtons pas aux apparences, peut-être le paramètre A est-il très sensible aux autres variables, à Δn par exemple. Le calcul des différentielles du paramètre A se révélant par trop laborieux, nous nous sommes tournés vers l'analyse graphique. Nous avons donc tracé le graphique R-V pour trois barrières trapézoïdales différant seulement par le paramètre Δn (le rapport des concentrations γ étant pris égal à 1, R et A se confondent). Le résultat apparaît à la **figure 5.18**. Pour une augmentation de la longueur de la région centrale du trapèze de 0,40 à 0,60, nous notons une augmentation du rapport de rectification à 150 mV de 1,9 à 3,3. Les paramètres R et A dépendent donc étroitement de Δn . En portant en graphique R(150) en fonction de Δn , nous nous sommes aperçus qu'il existait, du moins pour des valeurs de Δn comprises entre 0,30 et 0,70, une relation exponentielle entre ces deux variables.

Nous avons donc défini un autre paramètre d'asymétrie, A^* , qui tiendrait compte de cet effet de la longueur de la section centrale du trapèze. Le paramètre A^* est défini par l'équation 5.4 :

$$A^* (v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n) \equiv \frac{\ln A (v, \gamma, \Delta\phi, \Delta n)}{\Delta n} \quad [5.4]$$

Les valeurs numériques de A^* pour les quinze courbes traitées apparaissent dans la dernière colonne du tableau 9. Si nous traçons maintenant le graphique de $A^*(150)$ en fonction de $\Delta\psi_d$ (**figure 5.19**), nous obtenons une relation quasi linéaire (coefficient de corrélation de 0,912). Les petites variations du paramètre n_1 (voir tableau 8) étaient donc à l'origine du faible degré de liaison entre les variables A et $\Delta\psi_d$. Nous pouvons affirmer également que la relation exponentielle obtenue à la figure 5.16 était purement fortuite. (D'autant plus fortuite que quatorze points apparaissaient sur cette courbe ! ⁴⁰).

⁴⁰ Le point vraiment à l'écart s'explique maintenant car il correspond à une barrière trapézoïdale dont la région centrale est beaucoup plus large ($\Delta n = 0,66$) que la moyenne des autres résultats ($\Delta n = 0,47$).

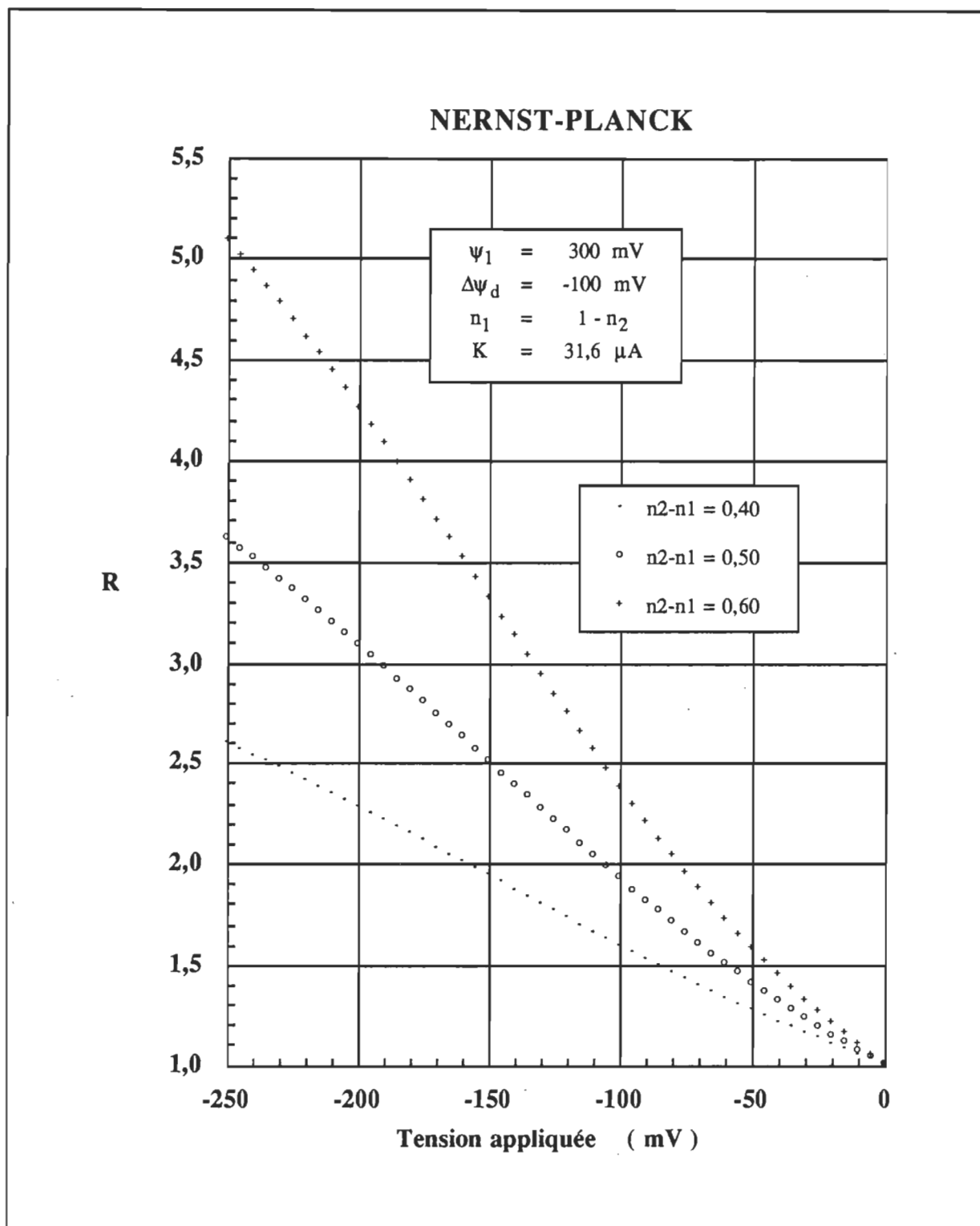


Figure 5.18. – Graphique illustrant l'effet de la longueur de la section centrale du trapèze ($n_2 - n_1$) sur le rapport de rectification. Les rapports de rectification furent calculés à partir de trois fichiers $I(V)$ créés à partir de l'équation 2.35. La valeur des autres paramètres de la barrière sont fournis dans l'encart.

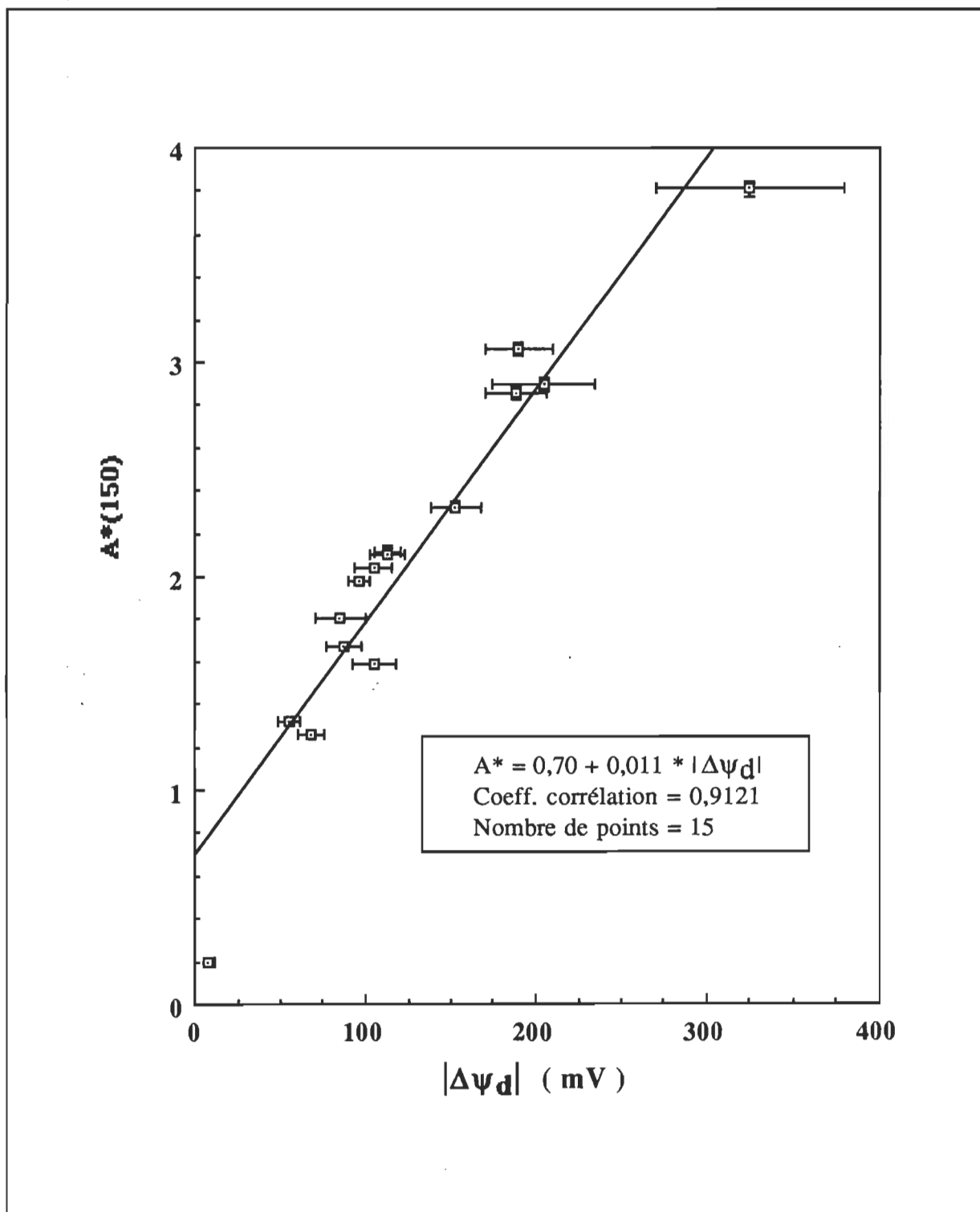


Figure 5.19. – Graphique du paramètre d'asymétrie A^* à +150 mV en fonction de $|\Delta\psi_d|$. (Les données numériques apparaissent au tableau 9).

Peut-on obtenir un coefficient de corrélation entre deux paramètres d'asymétrie se rapprochant encore plus de 1 ? La réponse est affirmative comme en témoigne la **figure 5.20**. Nous avons mis ici en abscisse la valeur absolue de $\Delta\psi$ plutôt que celle de $\Delta\psi_d$. Le coefficient de corrélation de 0,969 est très satisfaisant. Si l'on tient compte des barres d'erreurs, presque tous les points s'alignent sur la droite. L'accord n'est pas encore parfait mais n'oublions pas que les paramètres A et A* ne sont strictement valides que pour $n_1 + n_2 = 1$. N'oublions pas non plus que les paramètres d'asymétrie que nous avons examinés dépendent, de manière moins sensible il est vrai, de n_1 et de ψ_1 . Si l'on néglige ces effets, de deuxième ordre pourrait-on dire, nous pouvons écrire :

$$A^* (v, |\Delta\phi|) = B (v) |\Delta\phi| \quad [5.5]$$

- A* : paramètre d'asymétrie normalisé (-)
- B : constante de proportionnalité dépendant de la tension (-)
- $\Delta\phi$: différence de potentiel entre les deux coins de la barrière trapézoïdale (-)

Le paramètre A* ne dépend donc plus que de la valeur absolue de $\Delta\psi$ et de la tension appliquée V. La pente de la droite de la figure 5.20 nous donne la constante de proportionnalité B. À 150 mV, B vaut 30 V^{-1} . En multipliant par le facteur $RT/3$, nous obtenons $B(150) = 0,77$.

Le procédé d'extraction de la barrière peut donc être considéré fiable. Mais comme une deuxième vérification est rarement superflue, nous allons, dans la prochaine sous-section, comparer les résultats que nous avons obtenus sur une courbe de la littérature avec les valeurs fournies par les auteurs.

5.6.4 Comparaison des résultats avec Schoch & coll.

La caractérisation la plus complète que l'on retrouve dans la littérature de la barrière d'énergie potentielle trapézoïdale fut effectuée par Schoch & coll. (1979). La courbe I-V traitée par Schoch & coll. fut prise sur une membrane PS/PS limitée par des solutions électrolytiques asymétriques. Cette asymétrie est telle que nous nous retrouvons en trans avec un potentiel de Gouy pratiquement nul alors que du côté opposé nous avons un potentiel de Gouy caractéristique d'une interface de PS chargée. Nous sommes donc dans une situation où $\Delta\psi > 0$ et, comme attendu, la courbe I-V des auteurs montre une asymétrie positive.

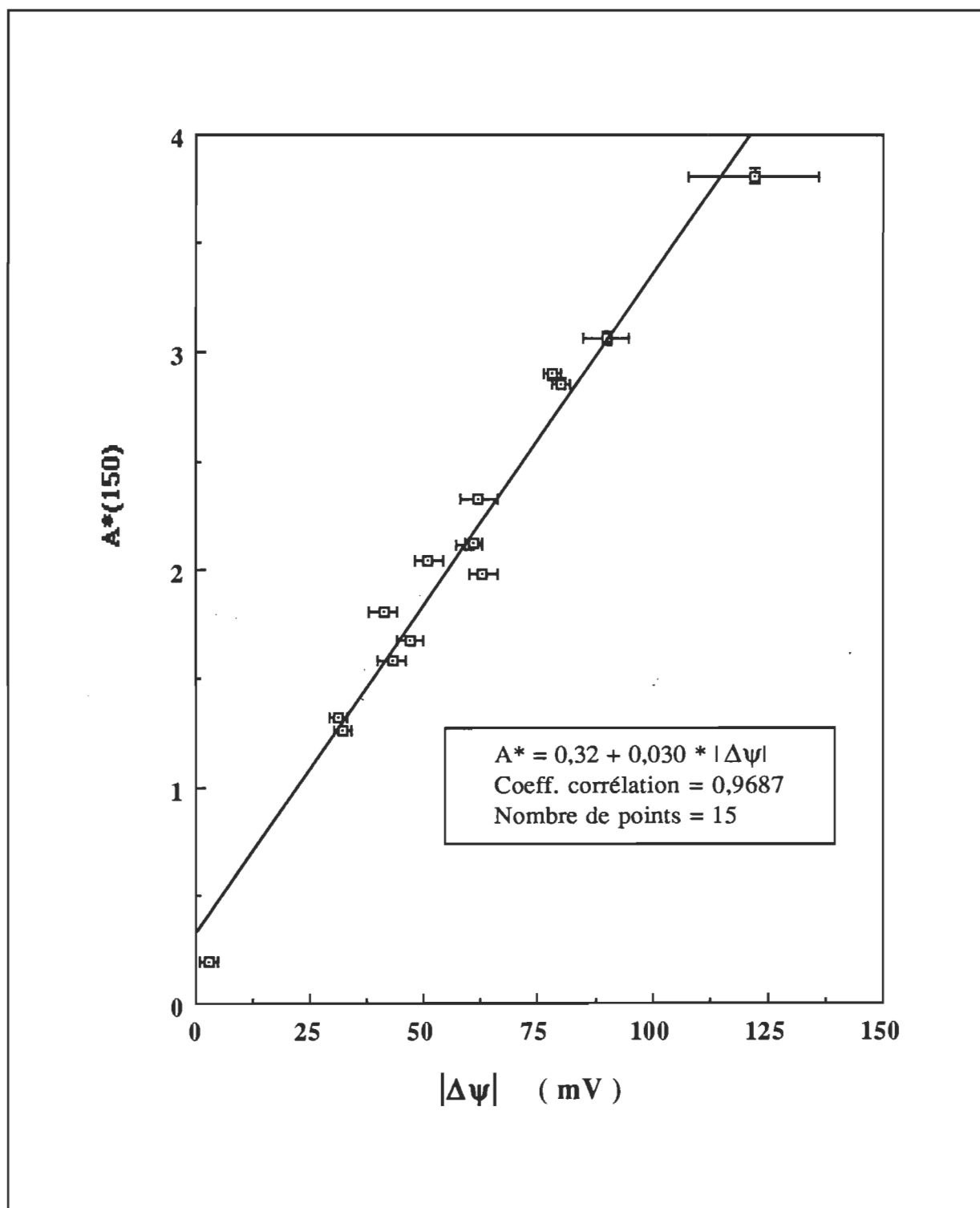


Figure 5.20. – Graphique du paramètre d'asymétrie A à +150 mV en fonction de $|\Delta\psi|$. (Les données numériques apparaissent au tableau 9).

Les auteurs ont procédé de la manière suivante: i) détermination de n_1 , $\Delta\psi$ et K à partir d'une courbe I-V sur la même membrane dans des conditions symétriques ($\Delta\psi = 1,6$ mV), ii) détermination de K et $\Delta\psi$ de la courbe asymétrique en prenant la valeur de n_1 déterminée en i) et iii) calcul de ψ_1 à partir de K . Soulignons que l'extraction de la barrière de potentiel par Schoch & coll. fut effectuée à partir de l'expression tronquée (équation 2.37b).

Nous retrouvons au tableau 10, les résultats obtenus par les auteurs de même que ceux que nous avons obtenus à partir de l'expression complète.

Tableau 10
Comparaison de la barrière trapézoïdale obtenue avec celle de Schoch & coll. (1979)

Paramètres	Schoch & coll.(1979)	Nos résultats
K_{NP} (A)	2,31 E-05	1,92 E-05
ψ_1 (mV)	290	261 ± 2
ψ_2 (mV)	351 ± 8	324 ± 3
$\bar{\psi}$ (mV)	320 ± 4	293 ± 3
ϕ_1^* ‡	22,0	21,1
n_1	$0,13 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,01$
n_2	$0,87 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,01$
$\Delta\psi_d$ (mV)	82 ± 11	96 ± 6

‡ La variable ϕ_1^* fut calculée à partir de 2.62 avec K_{NP} exprimé en A.

Les données obtenues sont bel et bien comparables. Tel que mentionné antérieurement, la formule tronquée surévalue la grandeur Δn et sous-évalue celle de $\Delta\psi_d$. Les écarts observés ici, 12% et 15% respectivement, rejoignent ceux calculés à partir d'un exemple similaire (section 5.6.1). Notre procédé d'extraction semble donc au point.

Avant de passer à la section des potentiels transmembranaires, nous aimerions nous pencher un peu sur la valeur anormalement élevée de Δn que nous avons tirée de la courbe de Schoch & coll. Cet écart origine, selon nous, de la façon dont les auteurs fabriquent leurs bicouches. En ne laissant pas le temps au solvant de déposition de s'évaporer, les bicouches formées contiennent une quantité appréciable de solvant. La valeur de capacité spécifique

de $530 \text{ nF}\cdot\text{cm}^{-2}$ de la bicouche étudiée par les auteurs ne laisse planer que peu de doutes à ce sujet. Si nous utilisons l'approximation du condensateur à plaques parallèles, nous obtenons, avec une valeur de permittivité de 2,2, une épaisseur de la région hydrocarbonée de 3,7 nm. Si nous prenons la valeur de n_1 déterminée (0,17) et que nous la multiplions par cette épaisseur, nous arrivons à 0,6 nm. Si l'on compare avec les bicouches formées au laboratoire dont l'épaisseur moyenne est de 2,7 nm, et que nous prenons une valeur moyenne de n_1 pour celles-ci de 0,26, nous arrivons à 0,7 nm, soit à peu de chose près la même chose. Le résultat est intéressant car il semble démontrer que la montée de potentiel s'effectue sur la même distance, peu importe l'épaisseur de la région hydrocarbonée. Voilà un deuxième acquis important résultant de ce travail.

Il eût été intéressant de comparer la différence de potentiel $\Delta\psi_d$ entre une bicouche contenant du solvant et une n'en contenant point, malheureusement aucune autre courbe courant-tension n'a été prise dans la littérature sur des bicouches PS/PS formées dans des conditions asymétriques.

5.7 Potentiels transmembranaires mesurés et prédictions de la théorie de Gouy-Chapman-Stern

Nous venons de voir à la section précédente que les barrières de potentiels extraites selon la théorie de Nernst-Planck à l'aide du programme TPZIV sont consistantes. Attardons-nous maintenant aux valeurs obtenues de la différence de potentiel rapportée sur l'épaisseur de la région de translocation (avant-dernière colonne du tableau 8).

Comparons ces valeurs avec celles prédites par la théorie de Gouy-Chapman-Stern. Les équations dont nous nous servons ici ont été dérivées au chapitre II. Il s'agit des équations 2.14 et 2.15. L'équation-maîtresse de Gouy-Chapman-Stern (eq. 2.14) fut résolue à l'aide de l'algorithme de Newton-Raphson (Ralston & Rabinowitz, 1978, §8.4). Le programme que nous avons conçu tient également compte des chutes de concentration des contre-ions suite à leur adsorption à l'interface chargée, chutes directement reliées au rapport de la surface d'adsorption sur le volume de phase aqueuse. À chaque itération, des nouvelles valeurs de la concentration de contre-ions, du pH du coeur de phase, du pH surfacique, de la densité surfacique et du potentiel à la surface sont calculées, jusqu'à ce que le potentiel à

la surface ne varie pas plus de 1 μV . Une dizaine d'itérations suffisent généralement. Les constantes nécessaires à la résolution de l'équation pour les différentes conditions apparaissent au **tableau 11**.

Tableau 11
Paramètres utilisés pour calculer les potentiels dus à la double couche électrique

<i>Lipides</i>	PE	PG	PS
pK (groupement PO_4^-)	0,3	2,1	0,7
Aire moléculaire (nm^2)	0,70	0,70	0,70
K_K (M^{-1})	0,05	0,2	0,2
K_{Li} (M^{-1})	0,1	0,5	0,8
K_{Ca} (1:2) (M^{-1})	5	15	25
<i>Phases aqueuses (mM)</i>	KCl 10	KCl 10 + LiCl 90	KCl 100
Température °C	22°C	22°C	22°C
Permittivité relative	78,0	78,0	78,0
pH	5,1	5,6	5,5
Force ionique (mM)	10	100	100

Les valeurs des pK des phospholipides et des constantes d'adsorption ioniques sont tirées des revues de Cevc (1990) et de Tocanne & Teissié (1990). Cinq (5) mesures du pH furent effectuées pour chacune des phases aqueuses. Le rapport surface/volume est de $0,001 \text{ m}^{-1}$.

Une fois les potentiels dus aux doubles couches déterminés, il nous suffit de soustraire la valeur du potentiel du côté trans de celle du côté cis pour connaître $\Delta\psi_{\text{DC}}$ (équation 2.15). Nous avons calculé $\Delta\psi_{\text{DC}}$ pour chacune des situations expérimentales correspondant aux courbes I-V traitées. Les valeurs de $\Delta\psi_d$ et $\Delta\psi_{\text{DC}}$ apparaissent au **tableau 12**.

Si l'on ajoute une marge d'erreur d'environ 15% sur les valeurs calculées de $\Delta\psi_{\text{DC}}$, le tableau montre que les deux potentiels diffèrent dans 8 cas sur 15. Dans cinq cas, la valeur de $\Delta\psi_d$ est plus élevée que celle prédite par le théorie de Gouy-Chapman-Stern, dans les trois autres, elle est plus faible.

Tableau 12
 Comparaison entre les mesures de $\Delta\psi_d$ obtenues et les valeurs de $\Delta\psi_{DC}$
 calculées à l'aide de la théorie de Gouy-Chapman-Stern.

Courbe I-V #	Lipides	Phase aqueuse mM	pH –	$\Delta\psi_d$ mV	$\Delta\psi_{DC}(GCS)$ mV
871129A2	DOPE/DOPE	KCl 100	5,5	-8 ± 3	0
880722A5	DOPE/DOPG	KCl 10 + LiCl 90	5,6	-190 ± 20	-86
880720A3	DOPE/DOPG	KCl 10 + LiCl 90	5,6	-87 ± 10	-86
880826B3	DOPE/DOPG	KCl 100	5,5	-105 ± 11	-97
880816A3	DOPE/DOPG	KCl 10	5,1	-55 ± 6	-149
881104D2	DOPE/DOPS	KCl 100	5,5	-113 ± 8	-97
861206J5	DOPE/DOPS	KCl 100	6,0	-113 ± 10	-98
881106A5	DOPE/DOPS	KCl 10	5,1	-85 ± 15	-131
880629D3	DOPG/DOPE	KCl 10 + LiCl 90	5,6	189 ± 18	86
880629B5	DOPG/DOPE	KCl 10 + LiCl 90	5,6	205 ± 30	86
880630A6	DOPS/DOPE	KCl 10 + LiCl 90	5,6	105 ± 13	79
881106B3	DOPS/DOPE	KCl 10	5,1	68 ± 8	131
Hall 1976	PE/PS	KCl 50	5,5	-153 ± 15	-111
Latorre. 1978	PE/PS	KCl 10	6,0	-320 ± 55	-150
Schoch 1979	PS/PS ^o	KCl 10 / K10+ CaCl 1	7,0	96 ± 6	86

Intéressons-nous dans un premier temps à ces trois dernières valeurs. Deux explications peuvent être amenées: i) l'épaisseur de la barrière de translocation est plus petite que la distance séparant les deux plans de charges superficielles, ii) la densité de charge superficielle réelle est plus faible que celle attendue ($\sigma < 1 \text{ charge}/0,7 \text{ nm}^2$). Si l'on prend ainsi (explication i) que la distance entre les plans de charges est le double de l'épaisseur de la région hydrocarbonée, disons 6,0 nm comparativement à 3,0 nm, nous aurons un potentiel transmembranaire dû aux potentiels de Gouy égal au double de la valeur de $\Delta\psi_d$. L'explication tiendrait si ce n'était du fait que le rapport $\Delta\psi_{DC}/\Delta\psi_d$ n'est pas constant, et surtout qu'il est parfois inférieur à 1 (les plans de charges ne sont quand même pas en deçà de la barrière de translocation !). La deuxième explication est intéressante car elle n'a pas un caractère statique. En effet, compte tenu de la possibilité - bien réelle - que les lipides se mélangent lors de la formation de la membrane, et que se mélange soit variable, la variation de σ permet d'expliquer les trois valeurs dont il est question. Il en est autrement toutefois des cinq courbes I-V pour lesquelles la valeur de $\Delta\psi_d$ excède la valeur prédite par la théorie de Gouy-Chapman-Stern. Comment peut-on inférer des densités superficielles de charges excédant 1 charge élémentaire/ $0,7 \text{ nm}^2$?

Manifestement, l'explication doit être cherchée ailleurs. Peut-être la valeur de $\Delta\psi$ mesurée inclut-elle une asymétrie du potentiel de distribution ? Mais l'absence de corrélation entre la concentration de nonactine en solution et la hauteur moyenne de la barrière nous force à abandonner cette hypothèse. Peut-être la valeur de $\Delta\psi$ mesurée inclut-elle une asymétrie du potentiel dipolaire ? Cette éventualité n'est pas à exclure vu la composition asymétrique des bicouches formées. Tentons de quantifier cet effet quelque peu. Prenons la courbe 880722A5 en exemple. Le $\Delta\psi$ mesuré pour cette courbe est de -90 mV, Δn est de 0,47 (la région centrale occupe 47% de la base du trapèze). Si nous supposons une différence du potentiel dipolaire de -50 mV (autrement dit, que le potentiel dipolaire de la DOPG est de 50 mV inférieur à celui de la DOPE) et que la position des plans de charges partielles positives coïncident avec N_1 et N_2 , nous obtenons une différence de potentiel dipolaire ramenée sur toute l'épaisseur de la barrière de -106 mV. Si nous ajoutons cette contribution à celle due à la double couche électrique (-86 mV), nous en arrivons à -192 mV. Nous pouvons donc, en invoquant des "asymétries dipolaires" de cet ordre, expliquer les cinq résultats pour lesquels $\Delta\psi_d$ dépasse notablement la valeur prédite par la théorie de Gouy-Chapman-Stern.

Il faut maintenant se demander si une asymétrie dipolaire de cette amplitude est possible. Nous avons amorcé dans ce but, au laboratoire, une étude sur le potentiel à l'interface air-eau de films de DOPE, DOPS et DOPG. Les résultats préliminaires montrent que les différences de potentiels entre lipide chargé et lipide neutre excèdent en moyenne de 50 mV la valeur prédite par la théorie de Gouy-Chapman-Stern, comme si le potentiel dipolaire des lipides anioniques à l'étude était de 50 mV plus petit que celui de la DOPE... L'hypothèse de l'asymétrie dipolaire trouve ici un bon appui. L'on peut rétorquer que la différence de potentiel dipolaire entre deux lipides à l'interface air-eau n'est pas la même que celle entre les deux mêmes lipides se faisant face dans une bicouche plane du type Montal-Mueller, que l'orientation des molécules d'eau peut différer dans les deux cas. Nous en convenons. Mais cet argument ne discrédite pas notre hypothèse, bien au contraire. Il suffit, afin d'expliquer l'ensemble des données où $\Delta\psi_d > \Delta\psi_{DC}$, de poser que l'orientation des molécules d'eau diffère quelque peu⁴¹ d'un type de bicouche à l'autre, voire d'une bicouche de même composition à l'autre.

⁴¹ Notons que l'orientation perpendiculaire d'1% des molécules d'eau à l'interface air-eau suffit théoriquement à causer une variation de ΔV de 50 mV (équation 2.16).

En principe, nous pouvons séparer les deux contributions (de Gouy et dipolaire) en faisant varier la composition ionique des compartiments aqueux. L'idéal serait de perfuser les bassins avec une solution de CaCl_2 et de suivre, pour une bicouche donnée, l'évolution de la barrière de potentiel. La variation de $\Delta\psi_d$ que nous obtiendrions devrait correspondre à la variation du potentiel de Gouy; la valeur de $\Delta\psi_d$ restante, au potentiel dipolaire.

Résumé

§ 5.1 - Les mesures de capacité spécifique des bicouches phospholipidiques obtenues se sont révélées conformes aux informations structurales dont nous disposions. L'effet de l'épaisseur du support et la variabilité des mesures de capacité portent plus à réflexion. L'hypothèse retenue pour ces deux phénomènes fait appel à la présence de micelles inverses dans la zone de transition.

§ 5.2 - Les mesures de conductance des bicouches lipidiques pures semblent montrer que la conductance s'accroît avec la proportion de lipides chargés négativement. Ceci est en accord avec les données de la section 5.3.

§ 5.3 - Les courbes I-V des bicouches pures asymétriques en composition se sont avérées elles aussi asymétriques. Le sens de cette asymétrie semble démontrer que les cations seraient les porteurs de charge. Les lipides anioniques, en diminuant la barrière de potentiel du côté où ils se situent, favorisent le passage des cations vers la face opposée.

§ 5.4 - Les mesures de conductance des bicouches dopées se sont révélées extrêmement variables. Les paramètres causant cette variabilité n'ont pu être cernés.

§ 5.5 - La forme des courbes I-V expérimentales des bicouches phospholipidiques dopées à la nonactine fut trouvée identique à celle prédite par la théorie de Nernst-Planck. L'asymétrie observée put être qualitativement expliquée par la composition des bicouches formées.

§ 5.6 - La caractérisation des barrières de potentiel nous a fourni quelques résultats inédits. D'abord, le fait que la barrière de potentiel trapézoïdale des bicouches asymétriques est symétrique par rapport à la position des coins. Puis l'indication (courbe de Schoch & coll.) que la distance sur laquelle la barrière de potentiel "émerge" serait indépendante de l'épaisseur de la région hydrocarbonée. Enfin, le fait que l'aspect de cette barrière de potentiel peut varier grandement d'une bicouche à l'autre.

§ 5.7 - Seulement la moitié des valeurs de $\Delta\psi_d$ mesurées se sont trouvées en accord avec les valeurs prédites par la théorie de Gouy-Chapman-Stern. Les valeurs de $\Delta\psi_d$ inférieures aux valeurs prédites par la théorie ont pu être expliquées par une perte d'asymétrie originant du mode de formation des films Montal-Mueller; les valeurs supérieures, par la contribution possible du potentiel dipolaire au potentiel transmembranaire. La variabilité des champs électriques transmembranaires observés d'une bicouche à l'autre peut également être expliquée à l'aide de ces deux hypothèses.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Nous voici au terme de nos pérégrinations. Il est temps de faire un trait et tenter, avec un certain recul si possible, de mettre en lumière les points essentiels de la présente étude. Nous ne présenterons pas ces points de manière trop structurée, avec sous-sections, arguments et considérants; nous tenons seulement à laisser au lecteur un portrait, quelques images.

Mentionnons au départ qu'une grande partie du travail fut consacrée à mettre au point les montages, à établir les méthodologies. Périodes ingrates mais nécessaires à la cueillette de données véritablement utilisables. Il s'agissait d'améliorer les expériences en vue d'en arriver à une répétabilité. Et, ce n'est que depuis peu que nous pouvons prétendre avoir atteint cette étape. Il est ici question de répétabilité des expériences, pas de reproductibilité des données; la distinction s'impose. L'on peut aujourd'hui, avec une certaine assurance, fabriquer une bicouche, injecter le transporteur, prendre une courbe courant-tension mais de prédire ce qui sera affiché, enregistré et tracé, peu s'en faut. Manifestement, certaines variables échappent à notre contrôle.

S'agit-il de variables extérieures, telles la température, la pression, ou encore la géométrie des bassins ? S'agit-il de variables "intérieures", intrinsèques, liées expressément à la bicouche Montal-Mueller ? Nos inclinations présentes seraient plutôt pour la seconde proposition. Depuis ces dernières années, certains faits, certaines assertions, voire certains états d'âme, trouvent écho dans la littérature; faits, assertions et impressions à l'effet d'une

physico-chimie de ces structures plutôt complexe. Laissons Stephen White (1986) nous dire quelques mots à ce propos (pp. 4-5):

“ The bilayer itself consumes most of our attention, and we thus largely ignore the annular border. Such neglect is not wise if one wishes to control the bilayer. These two parts or phases of the system tend toward chemical equilibrium with one another. The secret to the control of bilayer behavior and composition is the control of annulus or any other more massive phases it contacts (...). The lipid is present in the solvent as hydrated aggregates (micelles), which tend toward equilibrium with the bulk aqueous phase. The annulus is a multicomponent system and can exhibit a complex phase behavior (...). Microemulsions are generally formed from three-component systems consisting of a surfactant, a nonpolar solvent, and a polar solvent. The bulk forming solution has these ingredients when one considers that water, even if not specifically added, must eventually be present in the annulus. ”

Ces propos font référence aux films noirs de Mueller-Rudin mais nous avons tout lieu de croire qu'ils peuvent, pour la plupart, être étendus aux bicouches Montal-Mueller dont il est question ici. Un système à la physico-chimie complexe donc, mais qui se trouve de plus, dans une situation de non-équilibre. Cette situation de non-équilibre n'est reconnue que depuis peu, comme en témoignent ces lignes de Niles & coll. (1988, p. 332):

“ That it is difficult to reach equilibrium with diacylphospholipid/hydrocarbon mixtures is well known (White, 1986). Protocols to reach equilibrium with BLMs prepared from phospholipid/alkane mixtures have been developed (Requena and Haydon, 1975). Procedures to reach equilibrium with MM films have not been as rigorously evaluated. ”

Les propriétés des bicouches Montal-Mueller dépendent du temps. La bicouche possède sa propre histoire, disions-nous, à la section 4.2. Système complexe, non-équilibre, historicité des phénomènes: peut-on encore s'étonner de la variabilité des bicouches Montal-Mueller ? Des chercheurs oeuvrant sur des films noirs (Picard & coll., 1991) témoignent enfin de cette variabilité (p. 3706):

“ The investigation of a large number of samples established subtle variations in the observable parameters (appearance of concentric interference fringes, capacitance, voltage-dependent capacitance, resistivity, and voltage-dependent resistivity changes as a function of hydrostatic pressure and applied potential) of separately formed, but otherwise identical, BLMs. It was deemed important, therefore, to perform all needed determinations on the same BLM preparation by simultaneous electrical and spectroscopic measurements. ”

D'autres (Toyoma & coll., 1991), scrutant les variations de capacité en fonction de la tension de bicouches Montal-Mueller, s'exclament (p. 941):

"- All the parameters were differed (sic) membrane to membrane. "

Cette variabilité et ce comportement irreproductible en fonction du temps compliquent souverainement le traitement statistique des résultats. Lorsque résultats il y a, sommes-nous tentés d'ajouter car certaines mesures requièrent vraiment une patience d'ange. La fragilité des bicouches planes est de notoriété publique... Et si concours il y avait, il semble bien que les bicouches formées par la technique Montal-Mueller l'emporteraient sur leurs noires cousines. Contentons-nous de citer Bamberg & coll. (1981), p. 7504:

" The solvent-free lipid bilayers (MMM) are unstable in the presence of purple membrane, whereas solvent-containing bilayer can be formed easily. "

et Pawlak & coll. (1991), p. 95:

" In the presence of mellitin the virtually solvent-free bilayers turned out to be much less stable than the solvent containing painted membranes. We therefore settled on the latter type of bilayers and did only a few control experiments with the monolayer (sic) technique. "

Ces différences originent selon nous du mode de formation de ces deux types de bicouches. Dans un cas, la formation se fait spontanément (le système s'organise à sa guise) alors que dans l'autre, la formation est forcée (en élevant alternativement les niveaux d'eau, nous forçons la membrane à s'organiser). La différence n'est pas mince.

La fragilité des bicouches Montal-Mueller, la non-reproductibilité de leurs propriétés, leur instabilité temporelle: tous ces éléments ont forcément concouru à l'élaboration, de la part des chercheurs, de trucs, de procédés, visant à remédier à ces inconvénients; mais, vu le secret les entourant, à l'élaboration aussi de tout un folklore dont nous avons peine à sortir. En 1982, Szabo et Waldbillig écrivaient encore (p. 253):

" It must be noted that the formation of bilayers from monolayers is something of an art in that certain chemically and physically inexplicable maneuvers seem to facilitate membrane formation. "

Mais tout ceci ne devrait pas nous faire perdre de vue les progrès et les avancées, fussent-ils modestes, que ce soit ici à Trois-Rivières, ou ailleurs.

Tour d'horizon des principaux résultats

Nous ne commenterons pas ici l'ensemble des résultats figurant dans les chapitres qui précèdent. Nous nous bornerons aux deux seuls points suivants: les courbes courant-tension des bicouches lipidiques pures et la caractérisation des barrières de potentiel, pour les autres, nous référons le lecteur aux résumés de fin de chapitre.

Les courbes courant-tension des bicouches lipidiques pures que nous avons enregistrées au laboratoire marquent à notre avis un tournant dans la caractérisation des potentiels membranaires. L'asymétrie de ces courbes et surtout leur bon rapport signal sur bruit, nous laissent espérer qu'à l'aide d'un modèle adéquat nous pourrions en extraire la barrière de potentiel. Déjà une partie du travail pourrait être effectuée à l'aide des équations développées au chapitre II. Caractériser la barrière de potentiel sans l'ajout de transporteurs, d'ions liposolubles, ou de sondes fluorescentes, ne tient peut être plus de la chimère.

La contribution importante la plus immédiate est sans conteste la détermination des quinze barrières de potentiel trapézoïdales. D'aucuns répliqueront que l'origine de l'asymétrie demeure incertaine, que la variabilité des profils obtenus est suspecte, mais en regard de ce qui fut rapporté à ce jour, il y a lieu, croyons-nous, de souligner les résultats obtenus. Nous avons dressé un tableau des déterminations des barrières de potentiels apparaissant dans la littérature (**tableau 13**).

Des seize "extractions" colligées, six le furent selon la théorie de Eyring (lignes en italique). Nous ne pouvons - sérieusement ! - accorder quelque sérieux à ces tentatives. Les auteurs en cause confondent facilement vessies et lanternes. Primo, ils prétendent voir deux (oui deux) discontinuités sur les représentations *logarithmiques* du courant en fonction de la tension alors que leurs courbes I-V sont lisses et monotones. Secundo, à l'aide d'une expression "dérivée" intuitivement, ils prétendent extraire le potentiel transmembranaire à partir d'un des points de "cassure". Tertio, ils fabriquent une courbe de calibration tirée de nulle part et qui ne sert, selon toute évidence, qu'à brouiller les pistes. Les auteurs poussent

l'outrecuidance jusqu'à prendre la peine d'ajouter que leurs résultats concordent bien avec la théorie de Gouy-Chapman ! Non, mais...

Tableau 13
Valeurs des paramètres des barrières extraites dans la littérature ($n_1+n_2=1$)

Auteurs (1 ^{er})	Membrane	Lipides	Sonde	Théorie	ψ_1 mV	n_1	$\Delta\psi$ mV	$\Delta\psi_d$ mV	Variables
HALL 73	MR	PEB (C ₁₀)	Non-K+	NP	≈ 335	0,27	0*	0*	$\Delta\psi, n_1$
HLADKY 74	MR	PEB (C ₁₀)	Non-K+	NP	?	0,20	0*	0*	n_1
GINSBURG 76	MR	PEB (C ₁₀)	Non-K+	NP	?	0,22	0*	0*	n_1
HALL 76	MM	PE/PS	Non-K+	EY	?	?	?	-86	?
KRASNE 76	MR	PEB (C ₁₀)	Non-K+	NP	?	0,14	0*	0*	n_1
LATORRE 76	MM	GDO/PEB	Non-K+	EY	?	0,32	?	101	?
MELNIK 77	MM	PEB/PEB	Non-K+	EY	?	0,32	0*	0*	?
HANSEN 78	MM	PE/PE ⁻	Val-K+	EY	?	0,28	?	?	n_1
HANSEN 78	MM	PS/PE	Non-K+	EY	?	0,47	?	?	n_1
SCHOCH 79	MM	PS ⁻ /PS ^o	Non-K+	NP	290	0,13	+61	+82	$\Delta\psi, n_1, K$
HALL 81	MM	PE/PS:PE 10:1	Non-K+	EY	?	?	?	-80	?
GLIOZZI 83	MR	Bipolaires	Val-K+	NP	?	0,14	≈ 0	≈ 0	$\Delta\psi, n_1$
BENZ 84	MR	PEB (C ₁₀)	FCCP	NP	?	0,17	0*	0*	n_1
KRISHNA... 84	Mitoch.	??	H+/OH-	NP	?	0,20	?	?	n_1
KRISHNA... 84	MLV	Asolectine	Non-K+	NP	?	0,12	?	?	n_1
VAN DIJK 85	MM	DPhPC/DPhPC	Non-K+	NP	?	0,30	0*	0*	n_1

MM: bicouches Montal-Mueller; MR: bicouches Mueller-Rudin; C₁₀: décane; Non: nonactine; Val: valinomycine; NP: Nernst-Planck; EY: Eyring. Pour les autres abréviations, se référer à la liste des abréviations. L'astérisque indique que ce paramètre fut fixé a priori.

Oublions ces données, et regardons les autres lignes du tableau. Nous nous retrouvons avec une dizaine de déterminations du paramètre n_1 , deux du paramètre ψ_1 et une seule de $\Delta\psi_d$ (effectuée par Schoch & coll.). Les quelque quatre-vingt données que nous avons présentées aux tableaux 7 et 8 comblent donc une importante lacune. Soulignons de nouveau que les dix extractions de barrière basées sur l'approche de Nernst-Planck apparaissant au tableau 13 le furent à l'aide de l'expression tronquée.

Un dernier mot

L'interprétation physique des profils de potentiel obtenus n'est pas une tâche facile. Beaucoup d'inconnues demeurent. Pour parler juste et mesurer juste, il nous faudrait connaître l'épaisseur diélectrique de la membrane, la distance entre les plans de dipôles, la distance entre les plans des charges superficielles, la distance de translocation du complexe. Il nous faudrait connaître aussi plus précisément le coefficient de partage et le coefficient de diffusion du complexe dans la membrane. Caractériser ne serait-ce qu'une seule matrice lipidique n'est pas une mince tâche: capacité et conductance n'y suffisent, et cette caractérisation doit s'accompagner de celles des autres phases du système (tore, couches limites, films à l'interface). En corrélant certaines données reliées à différentes propriétés de la bicouche, ou provenant encore de différentes phases du système, nous pourrions éventuellement mettre le doigt sur ce qui cause la variabilité des propriétés électriques des bicouches Montal-Mueller. Ce n'est qu'à partir de ce moment que nous pourrions, en toute sérénité, procéder à l'incorporation de protéines au sein de nos bicouches asymétriques et voir en quoi l'asymétrie de la barrière de potentiel influence le fonctionnement de ces protéines.

Nous nous en voudrions de ne pas terminer en citant de nouveau White (1986, p. 3):

" Planar bilayers can be incredibly frustrating. All of us who have worked with them have, at one time or another, been reduced to irrational (but satisfying) acts of anger. The frustration usually arises because one is, unknowingly, trying to do something that is thermodynamically unlikely. The number of beakers I sent crashing against the laboratory wall decreased as my understanding of the physical chemistry of the system increased. "

Aux capricieuses bicouches, opposons une systématique démarche !

BIBLIOGRAPHIE

ABRAHAM-SCHRAUNER, B. (1975). *Generalized Gouy-Chapman potential of charged phospholipid membranes with divalent cations*. J. Math. Biol. **2**, 333-339.

ADAMCZEWSKI, I. (1968). Les phénomènes d'ionisation et de conduction dans les diélectriques liquides Paris: Masson, 407 p.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. (1983). Molecular Biology of the Cell New York: Garland Publ. Inc., 1146 p.

ALMERS, W. & STIRLING, C. (1984). *Distribution of transport proteins over animal cell membranes*. J. Membrane Biol. **77**, 169-186.

ALVAREZ, O. (1986). *How to set up a bilayer system*. In Ion Channel Reconstitution Miller, C. (éd.). New York: Plenum Press, pp. 115-129.

ALVAREZ, O. & LATORRE, R. (1978). *Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers*. Biophys. J. **21**, 1-17.

ALVAREZ, O., BENOS, D. & LATORRE, R. (1985). *The study of ion channels in planar lipid bilayer membranes*. J. Electrophysiol. Tech. **12**, 159-177.

AMORY, D.E. & DUFEY, J.E. (1985). *Model for the electrolytic environment and electrostatic properties of biomembranes*. J. Bioenerg. Biomembr. **17**, 151-174.

ANDERSEN, O.S. (1978). *Permeability properties of unmodified lipid bilayer membranes*. In Membrane Transport in Biology Vol. I. Giebisch, G., Tosteson, D.C. & Ussing, H.H. (éds). New York: Springer-Verlag, pp. 369-446.

ANDERSEN, O.S., FELDBERG, S., NAKADOMARI, H., LEVY, S. & MCLAUGHLIN, S. (1978). *Electrostatic interactions among hydrophobic ions in lipid bilayer membranes*. Biophys. J. **21**, 35-70.

ANDERSEN, O.S. & FUCHS, M. (1975). *Potential energy barriers to ion transport within lipid bilayers: studies with tetraphenylborate*. Biophys. J. **15**, 795-830.

ANDREOLI, T.E. (1974). *Planar lipid bilayer membranes*. In Methods in Enzymology XXXII, Biomembranes Part B. Fleischer, S. & Packer, L. (éds). New York: Academic Press, pp. 513-539.

ANTONOV, V.F., PETROV, V.V., MOLNAR, A.A., PREDVODITELEV, D.A. & IVANOV, A.S. (1980). *The appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer membranes at the phase transition temperature*. Nature (Lond.) **283**, 585-586.

ARMSTRONG, C.M. (1981). *Sodium channels and gating currents*. Physiol. Rev. **61**, 644-683.

ASHCROFT, R.G., COSTER, H.G.L. & SMITH, J.R. (1977). *The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. The effect on benzyl alcohol on the structure*. Biochim. Biophys. Acta **469**, 13-22.

ASHCROFT, R.G., COSTER, H.G.L. & SMITH, J.R. (1981). *The molecular organisation of bimolecular lipid membranes: the dielectric structure of the hydrophilic/hydrophobic interface*. Biochim. Biophys. Acta **643**, 191-204.

ASHCROFT, R.G., COSTER, H.G.L., LAVER, D.R. & SMITH, J.R. (1983). *The effects of cholesterol inclusion on the molecular organisation of bimolecular lipid membranes*. Biochim. Biophys. Acta **730**, 231-238.

ATTWELL, D. (1979). *Problems in the interpretation of membrane current-voltage relations*. In Membrane Transport Processes, Vol. 3. Stevens, C.F. & Tsien, R.W. (éds). New York: Raven Press, pp. 29-41.

ATTWELL, D. & JACK, J. (1978). *The interpretation of membrane current-voltage relations: a Nernst-Planck analysis*. Prog. Biophys. Molec. Biol. **34**, 81-107.

AVEYARD, R. & HAYDON, D.A. (1973). An Introduction to the Principles of Surface Chemistry. Londres: Cambridge University Press, 232 p.

BABAKOV, A.V., ERMISHKIN, L.N. & LIBERMAN, E.A. (1966). *Influence of electric field on the capacity of phospholipid membranes*. Nature (Lond.) **210**, 953-955.

BACH, D. & MILLER, I.R. (1980). *Glyceryl monooleate black lipid membranes obtained from squalene solutions*. Biophys. J. **29**, 183-187.

BAKEEVA, L.E., GRINIUS, L.L., JASAITIS, A.A., KULIENE, V.V., LEVITSKY, D.O., LIBERMAN, E.A., SEVERINA, I.I. & SKULACHEV, V.P. (1970). *Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria*. Biochim. Biophys. Acta **216**, 13-21.

BAMBERG, E., DENCHER, N.A., FAHR, A. & HEYN, M.P. (1981). *Transmembraneous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 7502-7506.

BARBER, J. (1980). *Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis*. Biochim. Biophys. Acta **594**, 253-308.

BARBER, J., MILLS, J. & LOVE, A. (1977). *Electrical diffuse layers and their influence on photosynthetic processes*. FEBS Lett. **74**, 174-181.

BARBER, J. & SEARLE, G.F.W. (1979). *Double layer theory and the effect of pH on cation-induced chlorophyll fluorescence*. FEBS Lett. **103**, 241-245.

BARBIER-BRYGOO, H., GIBRAT, R., RENAUDIN, J.P., BROWN, S., PRADIER, J.M., GRIGNON, C. & GUERN, J. (1985). *Membrane potential difference of isolated plant vacuoles: positive or negative? II. Comparison of measurements with microelectrodes and cationic probes*. Biochim. Biophys. Acta **819**, 215-224.

BARLOW, J.R. (1970). *The electrical double layer*. In Physical Chemistry: an Advanced Treatise Vol. IXA /Electrochemistry. Eyring, H., Henderson, D. & Jost, W. (éds). New York: Academic Press, pp. 167-246.

BECHINGER, B. & SEELIG, J. (1991). *Interaction of electric dipoles with phospholipid head groups. A ^2H and ^{31}P NMR study of phloretin analogues in phosphatidylcholine membranes*. Biochemistry **30**, 3923-3929.

BELL, J. (1985). *Protons decrease the single channel conductance of the sarcoplasmic reticulum K^+ channel in neutral and negatively charged bilayers*. Biophys. J. **48**, 349-353.

BENTZ, J. & NIR, S. (1980). *Cation binding to membranes: competition between mono-, di- and trivalent cations*. Bull. Math. Biol. **42**, 191-220.

BENZ, R. & MCLAUGHLIN, S. (1983). *The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone)*. Biophys. J. **41**, 381-398.

BENZ, R. & STARK, G. (1975). *Kinetics of macrotetrolide-induced ion transport across lipid bilayer membranes*. Biochim. Biophys. Acta **382**, 27-40.

BERGELSON, L.D. & BARSUKOV, L.I. (1977). *Topological asymmetry of phospholipids in membranes*. Science **197**, 224-229.

BOCKRIS, J.O'M. & REDDY, A.K.N. (1970). Modern Electrochemistry Vol. 1. Chapitre 2. New York: Plenum Press.

BOHEIM, G., HANKE, W. & EIBL, H. (1980). *Lipid phase transition in planar bilayer membrane and its effect on carrier- and pore-mediated ion transport*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 3403-3407.

BRADSHAW, R.W. & ROBERTSON, C.R. (1975). *Effect of ionic polarizability on electrodiffusion in lipid bilayer membranes*. J. Membrane Biol. **25**, 93-114.

BRETSCHER, M.S. (1972). *Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes*. Nature New Biol. **236**, 11-12.

BRETSCHER, M.S. (1985). *Les molécules de la membrane cellulaire*. Pour la Science **98**, 66-79.

BRULLEMANS, M. (1987). Détermination des potentiels au sein des bicouches asymétriques par l'étude de la conductance ionique Séminaire I. 46 p.

BRULLEMANS, M. (1989). Adsorption d'un agent antitumoral (le Celiptium) à l'interface phosphatidylglycérol-eau: mesures électrophorétiques et mesures de potentiel et de pression à l'interface air-eau Bibliothèque de l'UQTR, Collection générale, 125 p.

BRULLEMANS, M. & TANCREDE, P. (1987). *Influence of torus on the capacitance of asymmetrical phospholipid bilayers*. Biophys. Chem. **27**, 225-231.

BRYNDA, E., NESPURKOVA, L. & NESPUREK, S. (1985). *Superlinearity of current-voltage characteristics of oxidized cholesterol bilayer membranes*. Czech. J. Phys. B **35**, 873-882.

CACECI, M.S. & CACHERIS, W.P. (1984). *Fitting curves to data: the simplex algorithm is the answer*. Byte **9**, 340-343.

CADENHEAD, D.A. (1985). *Monomolecular films as biomembrane models*. In Structure & Properties of Cell Membranes Vol. III: Methodology and Properties of Membranes. Benga, G. (éd.). Boca Raton: CRC Press Inc, pp. 21-63.

CAFFREY, M. & FEIGENSON, G.W. (1981). *Fluorescence quenching in model membranes. 3. Relationship between calcium adenosinetriphosphatase enzyme activity and the affinity of the protein for phosphatidylcholines with different acyl chain characteristics*. *Biochemistry* **20**, 1949-1961.

CAFISO, D., MCLAUGHLIN, A., MCLAUGHLIN, S. & WINISKI, A. (1989). *Measuring electrostatic potential adjacent to membranes*. *Meth. Enzymol.* **171**, 342-364.

CARNIE, S. & MCLAUGHLIN, S. (1983). *Large divalent cations and electrostatic potentials adjacent to membranes: a theoretical calculation*. *Biophys. J.* **44**, 325-332.

CASU, A, NANNI, G. & PALA, V. (1968). *Structure of membrane: 2) Fractionated hydrolisis by phospholipase A, C and D of phospholipids of sheep erythrocytes*. *Ital. J. Biochem.* **117**, 301-308.

CATTERALL, W.A., SCHMIDT, J.W., MESSNER, D.J. & FELLER, D.J. (1986). *Structure and biosynthesis of neuronal sodium channels*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **479**, 186-203.

CEVC, G. (1990). *Membrane electrostatics*. *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 311-382.

CEVC, G. & MARSH, D. (1983). *Properties of the electrical double layer near the interface between a charged bilayer membrane and electrolyte solution: experiment vs. theory*. *J. Phys. Chem.* **87**, 376-379.

CEVC, G. & MARSH, D. (1987). Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models. New York: Wiley-Interscience, 442 p.

CEVC, G., SVETINA, S. & ZEKS, B. (1981). *Electrostatic potential of bilayer membranes with the structural surface charge smeared perpendicular to the membrane-solution interface: an extension of the Gouy-Chapman diffuse double layer theory*. *J. Phys. Chem.* **85**, 1762-1767.

CHAPMAN, D.L. (1913). *A contribution to the theory of electrocapillarity*. *Philos. Mag.* **25**, 475-481.

CHERNOMORDIK, L.V., MELIKYAN, G.B., DUBROVINA, N.J., ABIDOR, I.G. & CHIZMADZHEV, Y.A. (1984). *Solvent-free bilayers from squalene solutions of phospholipids*. *Bioelectrochem Bioenerg.* **12**, 155-166.

CHERRY, R.J. & CHAPMAN, D. (1969). *Optical properties of black lecithin films*. J. Membrane Biol. **40**, 19-32.

CIANI, S. (1976). *Influence of molecular variations of ionophore and lipid on the selective ion permeability of membranes: II. A theoretical model*. J. Membrane Biol. **30**, 45-63.

CIANI, S.M., EISENMAN, G., LAPRADE, R. & SZABO, G. (1973). *Theoretical analysis of carrier-mediated electrical properties of bilayer membranes*. In Membranes. A Series of Advances. Eisenman, G. (éd.). New York: Marcel Dekker, pp. 61-77.

CIANI, S., EISENMAN, G. & SZABO, G. (1969). *A theory for the effects of neutral carriers such as macrotetralide actin antibiotics on the electric properties of bilayer membranes*. J. Membrane Biol. **1**, 1-36.

CLEMENTZ, T., CHRISTIANSSON, A. & WIESLANDER, A. (1988). *Effect of electrical potential on membrane organization and function*. In Physiological Regulation of Membrane Fluidity. Aloia, R.C., Curtain, C.C. & Gordon, L.M. (éds). New York: Alan R. Liss Inc., pp. 41-74.

COHEN, J.A. & COHEN, M. (1981). *Adsorption of monovalent and divalent cations by phospholipid membranes: the monomer-dimer problem*. Biophys. J. **36**, 623-651.

CONWAY, B.E. (1970). *Some aspects of the thermodynamic and transport behavior of electrolytes*. In Physical Chemistry: an Advanced Treatise Vol. IXA /Electrochemistry. Eyring, H., Henderson, D. & Jost, W. (éds). New York: Academic Press, pp. 1-166.

COOPER, K.E., JAKOBSSON, E. & WOLYNES, P.G. (1985). *The theory of ion transport through membrane channels*. Prog. Biophys. Molec. Biol. **46**, 51-96.

COPELAND, B.R. & ANDERSEN, H.C. (1981a). *A theory for ion binding and phase equilibria in charged lipid membranes. I. Proton binding*. J. Chem. Phys. **74**, 2536-2546.

COPELAND, B.R. & ANDERSEN, H.C. (1981b). *A theory for ion binding and phase equilibria in charged lipid membranes. II. Competitive and cooperative binding*. J. Chem. Phys. **74**, 2548-2558.

CORONADO, R. & AFFOLTER, H. (1986). *Insulation of the conduction pathway of muscle transverse tubule calcium channels from the surface charge of bilayer phospholipid*. J. Gen. Physiol. **87**, 933-953.

CORONADO, R. & LABARCA, P.P. (1984). *Reconstitution of single ion-channel molecules*. Trends Biochem. Sci. **9**, 155-160.

CORONADO, R. & LATORRE, R. (1983). *Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes*. Biophys. J. **43**, 231-236.

CUKIERMAN, S. (1991). *Asymmetric electrostatic effects on the gating of rat brain sodium channels in planar lipid membranes*. Biophys. J. **60**, 845-855.

CUKIERMAN, S., ZINKAND, C., FRENCH, R.J. & KRUEGER, B.K. (1988). *Effects of membrane surface charge and calcium on the gating of rat brain sodium channels in planar bilayers*. J. Gen. Physiol. **92**, 431-447.

DAMBACHER, K.H. & FROMHERZ, P. (1986). *Reversible bilayer junction of lipid monolayers: free mono-bi-monolayer contact*. Biochim. Biophys. Acta **861**, 331-336.

DATE, T. GOODMAN, J.M. & WICKNER, W.T. (1980). *Procoat, the precursor of M13 coat protein, requires an electrochemical potential for membrane insertion*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. **77**, 4669-4673.

DAVIES, J.T. & RIDEAL, E.K. (1961). Interfacial Phenomena New York: Academic Press.

DAVIS, J.A., JAMES, R.O. & LECKIE, J.O. (1978). *Surface ionization and complexation at the oxide-water interface: I. Computation of electrical double layer properties in simple electrolytes*. J. Colloid Interface Sci. **63**, 480-499.

DE LEVIE, R. (1978). *Mathematical modeling of transport of lipid-soluble ions and ion-carrier complexes through membranes*. Adv. Chem. Phys. **37**, 99-137.

DE LEVIE, R. & SEIDAH, N.G. (1974). *Transport of ions of one kind through thin membranes. III. Current-voltage curves for membrane-soluble ions*. J. Membrane Biol. **16**, 1-16.

DE PIERRE, J.W. & ERNSTER, L. (1977). *Enzyme topology of intracellular membranes*. Annu. Rev. Biochem. **46**, 201-262.

DEUTICKE, B. & HAEST, C.W.M. (1987). *Lipid modulation of transport proteins in vertebrate cell membranes*. Ann. Rev. Physiol. **49**, 221-235.

DILGER, J.P., FISHER, L.R. & HAYDON, D.A. (1982). *A critical comparison of electrical and optical methods for bilayer thickness determination*. Chem. Phys. Lipids. **30**, 159-176.

DOLOWY, K. (1987). *Membrane potential controlled lipid recycling and amoeboid locomotion*. J. Bioelectr. **6**, 109-128.

DONAVAN, J.J. (1979). The Effect of Membrane Composition on the Opening and Closing of Voltage-Dependant Channels in Lipid Bilayer. Thèse de doctorat. Univ. of Chicago. 169 p.

DORN, W.H. (1985). The Dipole Potential in Monolayers, Bilayers and Biological Membranes. Mémoire de maîtrise. Université de Toronto. 148 p.

DUNIEC, J.T. & THORNE, S.W. (1983). *Electrostatic potentials in membrane systems*. Bull. Math. Biol. **45**, 69-90.

EISENMAN, G. & HORN, R. (1983). *Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels*. J. Membrane Biology. **76**, 197-225.

ELLIOT, J.R., HAYDON, D.A., HENDRY, B.M. & NEEDHAM, D. (1985). *Inactivation of the sodium current in squid giant axons by hydrocarbons*. Biophys. J. **48**, 617-622.

ELLIOT, J.R., NEEDHAM, D., DILGER, J.P. & HAYDON, D.A. (1983). *The effects of bilayer thickness and tension on gramicidin single-channel lifetime*. Biochim. Biophys. Acta **735**, 95-103.

EMANUEL, N. & KNORRE, D. (1975). Cinétique chimique Moscou: Mir, 448 p.

ETEMADI, A.H. (1980). *Tendances organisationnelles des constituants des membranes biologiques et les problèmes de l'asymétrie de leur distribution*. Biochimie **60**, 347-375.

FAHEY, P.F. & WEBB, W.W. (1978). *Lateral diffusion in phospholipid bilayer membranes and multilamellar liquid crystals*. Biochemistry **17**, 3046-3053.

FELDBERG, S.W. & KISSEL, G. (1975). *Charge-pulse studies of transport phenomena in bilayer membranes. I. Steady-state measurements of actin- and valinomycin-mediated transport in glycerol monooleate bilayers*. J. Membrane Biol. **20**, 269-300.

FERRIS, C.D. (1974). *Introduction to bioelectrodes*. New York: Plenum Press, 240 p.

FETTIPLACE, R., GORDON, L.G.M., HLADKY, S.B., REQUENA, J., ZINGSHEIM, H.P., & HAYDON, D.A. (1975). *Techniques in the formation and examination of "black" lipid bilayer membranes*. In Methods of Membrane Biology Vol. 4. Korn, E.D. (éd.). New York: Plenum Press, pp. 1-75.

FINKELSTEIN, A. & MAURO, A. (1977). *Physical principles and formalisms of electrical excitability*. In Handbook of Physiology. Section 1: The Nervous System, Vol. 1. Cellular Biology of Neurons Kandel, E.R. (éd.). American Physiological Society, Bethesda, Maryland, pp. 161-213.

FLEISHER, S., MCINTYRE, J.O., CHURCHILL, P., FLEER, E., & MAURER, A. (1983). In Structure and Function of Membrane Proteins Quagliarielli, E. & Palmieri, F. (éds). Amsterdam: Elsevier, pp. 283-300.

FLEWELLING, R.F. & HUBBELL, W.L. (1986a). *Hydrophobic ion interactions with membranes. Thermodynamic analysis of tetraphenylphosphonium binding to vesicles*. Biophys. J. **49**, 531-540.

FLEWELLING, R.F. & HUBBELL, W.L. (1986b). *The membrane dipole potential in a total membrane potential model*. Biophys. J. **49**, 541-552.

FORNÉS, J.A. & PROCOPIO, J. (1987). *Influence of cholesterol on the surface charge density and surface potential of lipid bilayer membranes*. J. Colloid Interface Sci. **117**, 570-573.

FOWLER, R.H. & GUGGENHEIM, E.A. (1965). Statistical Thermodynamics Chap. 9. Cambridge: Cambridge University Press.

FOWLER, R.H. (1966). Statistical Mechanics 2^e édition, Chap. 8 et 13. Cambridge: Cambridge University Press.

FRAHM, J. & DIEKMANN, S. (1979). *Numerical calculation of diffuse double layer properties for spherical colloidal particles by means of a modified nonlinearized Poisson-Boltzmann equation*. J. Colloid Interface Sci. **70**, 440-447.

FRANKS, N.P. & LIEB, W.R. (1979). *The structure of lipid bilayer and the effects of general anaesthetics*. J. Mol. Biol. **133**, 469-500.

FRIPIAT, J., CHAUSSIDON, J. & JELLI, A. (1971). Chimie-physique des phénomènes de surface: applications aux oxydes et aux silicates Paris: Masson.

GALE, E.F., CUNDLIFFE, E., REYNOLDS, P.E., RICHMOND, M.H., & WARING, M.J. (1983). *Antibiotics affecting the function of the cytoplasmic membrane*. In The Molecular Basis of Antibiotic Action Chap. 4. New York: John Wiley, pp. 175-257.

GAMBALE, F., MENINI, A. & RAUCH, G. (1987). *Effects of calcium on the gramicidin A single channel in phosphatidylserine membranes: screening and blocking*. Eur. Biophys. J. **14**, 369-374.

GAWRISCH, K., ZIMMERBERG, J. & PARSEGHIAN, A. (1990). *Membrane dipole potentials and hydration forces: cause or effect?* Biophys. J. **57**, 35a.

GINSBURG, S. & NOBLE, D. (1976). *Use of current voltage diagrams in locating peak energy barriers in cell membranes*. J. Membrane Biol. **29**, 211-229.

GIRARD, M. (1989). Amplificateurs opérationnels Tome 2. Paris: McGraw-Hill, 369 p.

GLASER, R.W., LEIKIN, S.L., CHERNOMORDIK, L.V., PASTUSHENKO, V.F. & SOKIRKO, A.I. (1988). *Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores*. Biochim. Biophys. Acta **940**, 275-287.

GLASSTONE, S., LAIDLER, K.J. & EYRING, H. (1941). The Theory of Rate Processes New-York: McGraw-Hill, 611 p.

GLIOZZI, A. (1980). *The lipid bilayer: a model system for biological membranes*. In Bioenergetics and Thermodynamics: Model Systems Braibanti, A. (éd.). Boston: D. Reidel Publ. Co., pp. 377-390.

GLIOZZI, A. & ROBELLO, M. (1989). *Model systems: a strategy for studying biological membranes*. Colloids and Surfaces **35**, 135-150.

GLIOZZI, A., ROLANDI, R., DE ROSA, M. & GAMBACORTA, A. (1983). *Monolayer black membranes from bipolar lipids of archeobacteria and their temperature-induced structural changes*. J. Membrane Biol. **75**, 45-56.

GODT, R.E. (1981). *A simple electrostatic model can explain the effect of pH upon the force-pCa relation of skinned frog skeletal muscle fibers*. Biophys. J. **35**, 385-392.

GOORMAGHTIGH, E., BRASSEUR, R., VANDENBRANDEN, M. & CASPERS, J. (1982). *Evaluation of the lipid-drug association constant in model membranes. A monolayer approach*. Bioelectrochem. Bioenerg. **9**, 489-498.

GOUY, M. (1910). *Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte*. J. Phys. Paris. **9**, 457-468.

GRANT, C.W.M. (1983). *Lateral phase separations and the cell membrane*. In Membrane Fluidity in Biology Vol. 2. Aloia R.C (éd.). New York: Academic Press, pp. 131-150.

GRELL, E., FUNCK, T. & EGGERS, F. (1975). *Structure and dynamic properties of ion-specific antibiotics*. J. Supramol. Struct. **1**, 307-335.

GRINIUS, L. (1980). *Nucleic acid transport driven by ion gradient across cell membrane*. FEBS Lett. **113**, 1-10.

GRUEN, D.W.R. & WOLFE, J. (1982). *Lateral tensions and pressures in membranes and lipid monolayers*. Biochim. Biophys. Acta **688**, 572-580.

GUNN, R.B., WIETH, J.O. & TOSTESON, D.C. (1975). *Some effects of low pH on chloride exchange blood cells*. J. Gen. Physiol. **65**, 731-749.

GUR, Y., RAVINA, I. & BABCHIN, A.J. (1978). *On the electrical double layer theory: II. The Poisson-Boltzmann equation including hydration forces*. J. Colloid Interface Sci. **64**, 333-341.

GUY, H.R. (1985). *Amino acid side-chain partition energies and distribution of residues in soluble proteins*. Biochem. J. **47**, 61-70.

HABIB, M.A. & BOCKRIS, J.O'M. (1980). *Specific adsorption of ions*. In Comprehensive Treatise of Electrochemistry Vol. 1. Bockris, J.O'M., Conway, B.E. & Yeager, E. (éds). New York: Plenum Press, pp. 135-219.

HALL, J.E. (1981). *Voltage-dependent lipid flip-flop induced by alamethicin*. Biophys. J. **33**, 373-382.

HALL, J.E. & LATORRE, R. (1976). *Nonactin-K⁺ complex as a probe for membrane asymmetry*. Biophys. J. **16**, 99.

HALL, J.E., MEAD, C.A. & SZABO, G. (1973). *A barrier model for current flow in lipid bilayer membranes*. J. Membrane Biol. **11**, 75-97.

HAMAMOTO, T. & MONTAL, M. (1986). *Functional reconstitution of bacterial cytochrome oxidases in planar lipid bilayers*. Meth. Enzymol. **126**, 123-138.

HANSEN, B.D. (1978). Ion Transport in Asymmetric Phospholipid Bilayers Ph. D. Thesis, University of California at San Francisco, University Microfilms International, Ann Arbor, Michigan.

HAYDON, D.A. & HLADKY, S.B. (1972). *Ion transport across thin lipid membranes: a critical discussion of mechanisms in selected systems.* Q. Rev. Biophys. **5**, 187-282.

HAYDON, D.A. & MYERS, V.B. (1973). *Surface charge, surface dipoles and membrane conductance.* Biochim. Biophys. Acta **307**, 429-443.

HEINRICH, R., GAESTEL, M. & GLASER, R. (1982). *The electric potential profile across the erythrocyte membrane.* J. Theor. Biol. **96**, 211-231.

HEINZ, E. (1981). Electrical Potentials in Biological Membrane Transport New York: Springer-Verlag, pp. 86.

HENDERSON, D. (1983). *Recent progress in the theory of the electric double layer.* Prog. Surf. Sci. **13**, 197-224.

HENDRY, B.M., ELLIOTT, J.R. & HAYDON, D.A. (1985). *Further evidence that membrane thickness influences voltage-gated sodium channels.* Biophys. J. **47**, 841-845.

HERBETTE, L., BLASIE, J.K., DEFOOR, P., FLEISCHER, S., BICK, R.J., VAN WINKLE, W.B., TATE, C.A. & ENTMAN, M.L. (1984). *Phospholipid asymmetry in the isolated sarcoplasmic reticulum membrane.* Arch. Biochem. Biophys. **234**, 235-242.

HERMANN, R.B. (1972). *Theory of hydrophobic bonding. II. The correlation of hydrocarbon solubility in water with solvent cavity area.* J. Phys. Chem. **76**, 2754-2759.

HIGGINS, J.A. & EVANS, W.H. (1978). *Transverse organization of phospholipids across the bilayer of plasma-membrane subfractions of rat hepatocytes.* Biochem. J. **174**, 563-567.

HILLE, B., WOODHULL, A.M. & SHAPIRO, B. (1975). *Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH.* Phil. Trans. R. Soc. Lond. Series B **270**, 301-318.

HINKOVSKA, V.T., DIMITROV, G.P. & KOUMAVOV, K.S. (1986). *Phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram spermatozoa plasma membranes.* J. Biochem. **18**, 1115-1121.

HLADKY, S.B. (1972). *The steady-state theory of the carrier transport of ions*. J. Membrane Biol. **10**, 67-91.

HLADKY, S.B. (1973). *The effect of stirring on the flux of carriers into black lipid membranes*. Biochim. Biophys. Acta **307**, 261-269.

HLADKY, S.B. (1974). *The energy barriers to ion transport by nonactin across thin lipid membranes*. Biochim. Biophys. Acta **352**, 71-85.

HLADKY, S.B. (1975). *Test of the carrier model for ion transport by nonactin and trinactin*. Biochim. Biophys. Acta **375**, 327-349.

HLADKY, S.B. (1979). *The carrier mechanism*. Curr. Top. Membr. Transp. **12**, 53-164.

HLADKY, S.B. & GRUEN, D.W.R. (1982). *Thickness fluctuations in black lipid membranes*. Biophys. J. **28**, 251-258.

HLADKY, S.B. & HAYDON, D.A. (1973). *Membrane conductance and surface potential*. Biochim. Biophys. Acta **318**, 464-468.

HOROWITZ, P. & HILL, W. (1989). The Art of Electronics 2^e édition. Cambridge: Cambridge University Press, 1125 p.

HOULE, A. (1982). Propriétés électriques et spectroscopiques de membranes asymétriques: conception et réalisation de l'instrumentation Mémoire de maîtrise. Université Laval, 100 p.

HOUSLAY, M.D. & STANLEY, K.K. (1982). Dynamics of Biological Membranes. New York: John Wiley, 330 p.

HUANG, H.W. (1986). *Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime*. Biophys. J. **50**, 1061-1070.

HUBBARD, S.C. & BRODY, S. (1975). *Glycerophospholipid variation in choline and inositol auxotrophs of *Neurospora crassa**. J. Biol. Chem. **250**, 7173-7179.

HUBBELL, W.L. (1990). *Transbilayer coupling mechanism for the formation of lipid asymmetry in biological membranes*. Biophys. J. **57**, 99-108.

HUNTER, R.J. (1981). Zeta Potential in Colloid Science Ottewill, R.H & Rowell, R.L. (éds). London: Academic Press, 378 p.

HURWITZ, H.D. (1978). *Modèles d'interfaces en mécanique statistique*. In Propriétés électriques des interfaces chargées Schuhmann, D. (éd.). Paris: Masson, pp. 58-86.

ISRAELACHVILI, J.N (1978). *The packing of lipids and proteins in membranes*. In Light Transducing Membranes Structure, Function and Evolution Deamer, D.W. (éd.). New-York: Academic Press, pp. 91-107.

ISRAELACHVILI, J.N. (1985). Intermolecular and Surface Forces New York: Academic Press, 296 p.

JACKSON, R.C. & WHITE, W.R. (1981). *Phospholipid is required for the processing of presecretory proteins by detergent-solubilized canine pancreatic signal peptidase*. J. Biol. Chem. **256**, 2545-2550.

JAIN, M.K. (1983). *Nonrandom lateral organisation in bilayers and biomembranes*. In Membrane Fluidity in Biology Vol. 1. Aloia R.C (éd.). New York: Academic Press, pp.1-37.

JAIN, M.K. (1988). Introduction to Biological Membranes 2^e édition. New York: John Wiley, 423 pp.

JAMES, A.E. & WILLIAMS, D.J.A. (1985). *Numerical solution of the Poisson-Boltzmann equation*. J. Colloid Interface Sci. **107**, 44-59.

JANZ, G.J. & IVES, D.J.G. (1968). *Silver, silver chloride electrodes*. Ann. N.Y Acad. Sci. **148**, 210-221.

JONES, M.N. (1975). Biological Interfaces: an Introduction to the Surface and Colloid Science of Biochemical and Biological Systems New York: Elsevier, 240 p.

KALACHNIKOV, S. (1980). Electricité Moscou: Mir. 679 p.

KARNOVSKY, M.J., KLEINFELD, A.M., HOOVER, R.L., DAWIDOWICZ, E.A., MCINTYRE, D.E., SALZMAN, E.A. & KLAUSNER, R.D (1984). *Lipid domains in membranes*. J. Cell. Biol. **99**, 1-6.

KAUFMANN, K. & SILMAN, I. (1983). *The induction by protons of ion channels through lipid bilayer membranes*. Biophys. Chem. **18**, 88-99.

KILBOURN, B.T., DUNITZ, J.D., PIODA, L.A.R. & SIMON, W. (1967). *Structure of the K^+ complex with nonactin, a macrotetralide antibiotic possessing highly specific K^+ transport properties.* J. Mol. Biol. **30**, 559-563.

KING, G.I. & WHITE, S.H. (1986). *Determining bilayer hydrocarbon thickness from neutron diffraction measurements using strip-function models.* Biophys. J. **49**, 1047-1054.

KLEIJN, B. & BRUNER, L.J. (1983). *The influence of hydrophobic ions and dipolar molecules on the electrostatic barrier in biomembranes.* J. Theor. Biol. **100**, 139-152.

KLEIN, R.A. (1982). *Thermodynamics and membrane processes.* Q. Rev. Biophys. **15**, 667-757.

KNOLL, W. & STARK, G. (1975). *An extended kinetic analysis of valinomycin-induced Rb-Transport through monoglyceride membranes.* J. Membrane Biol. **25**, 249-270.

KNOLL, W. & STARK, G. (1977). *Temperature-jump experiments on thin lipid membranes in the presence of valinomycin.* J. Membrane Biol. **37**, 13-28.

KOLB, H.A. & LAUGER, P. (1978). *Spectral analysis of current noise generated by carrier-mediated ion transport.* J. Membrane Biol. **41**, 167-187.

KOSTYUK, P.G., MIRONOV, S.L., DOROSHENKO, P.A. & PONOMAREV, V.N. (1982). *Surface charges on the outer side of mollusc neuron membrane.* J. Membrane Biol. **70**, 171-179.

KRAFTE, D.S. & KASS, R.S. (1988). *Hydrogen ion modulation of Ca channel current in cardiac ventricular cells. Evidence for multiple mechanisms.* J. Gen. Physiol. **91**, 641-657.

KRASNE, S. & EISENMAN, G. (1976). *Influence of molecular variations of ionophore and lipid on the selective ion permeability of membranes: I. Tetranactin and the methylation of nonactin-type carriers.* J. Membrane Biol. **30**, 1-44.

KRISHNAMOORTHY, G. & HINKLE, P.C. (1984). *Non-ohmic proton conductance of mitochondria and liposomes.* Biochemistry **23**, 1640-1645.

KRULL, U.J., KOILPILLAI, R.N., RAE, C.O. & VANDENBERG, E.T. (1991). *Electrostatic and structural alterations of lipid monolayers and bilayers by interaction with valinomycin and phloretin.* Thin Solid Films. **195**, 279-288.

KUHN, A., WICKNER, W. & KREIL, G. (1986). *The cytoplasmic carboxy terminus of M13 procoat is required for the membrane insertion of its central domain.* Nature (Lond.) **322**, 335-339.

KWOK, R. & EVANS, E. (1981). *Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles.* Biophys. J. **35**, 637-652.

LAIDLER, K.J. & TWEEDALE (1971). Chemical Kinetics 2^e édition. New York: McGraw-Hill, 566 p.

LAPOINTE, J.Y. & LAPRADE, R. (1982). *Kinetics of carrier-mediated ion transport in two new types of solvent-free lipid bilayers.* Biophys. J. **39**, 141-150.

LAPRADE, R. (1977). *Les membranes artificielles lipidiques contenant des ionophores: un modèle de la membrane biologique et un outil d'étude des mécanismes moléculaires de la perméabilité membranaire.* Annales de l'ACFAS **44**, 59-66.

LASIC, D.D. (1989). *Les liposomes.* La Recherche **20**, 904-913.

LATORRE, R. & HALL, J.E. (1976). *Dipole potential measurements in asymmetric membranes.* Nature (Lond.) **264**, 361-363.

LATORRE, R. & HALL, J.E. (1978). *Membrane asymmetry and surface potentials in artificial lipid bilayer membranes.* In Membrane Transport Processes, Vol. 2. Tosteson, D.C., Ovchinnikov, Y.A. & Latorre, R. (éds). New York: Raven Press, pp. 313-323.

LAÜGER, P. (1987). *Charge transport across lipid bilayer membranes: lipophilic ions, ions carriers and channels.* In Bioelectrochemistry. II. Membrane Phenomena Milazzo, G. & Blank, M. (éds). New York: Plenum Press, pp. 197-217,

LAÜGER, P., BENZ, R., STARK, G., BAMBERG, E., JORDAN, P.C., FAHR, A. & BROCK, W. (1981). *Relaxation studies of ion transport systems in lipid bilayer membranes.* Q. Rev. Biophys. **14**, 513-598.

LAÜGER, P. & STARK, G. (1970). *Kinetics of carrier-mediated ion transport across lipid bilayer membranes.* Biochim. Biophys. Acta **211**, 458-466.

LÉONTOVITCH, M. (1986). Introduction à la thermodynamique. Physique statistique Moscou: Mir.

LEVINE, S. & BELL, G.M. (1966). *Modified Poisson-Boltzmann equation and free energy of electrical double layers in hydrophobic colloids*. J. Chem. Soc., Faraday Trans. II **42**, 69-80.

LEVITAN, H. & BARKER, J.L. (1972). *Effect of non-narcotic analgesics on membrane permeability of molluscan neurons*. Nature New Biol. **239**, 55-57.

LEVITT, D.G. (1986). *Interpretation of biological ion channel flux data: reaction-rate versus continuum theory*. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **15**, 29-57.

LEWIS, B.A. & ENGELMAN, D.M. (1983). *Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles*. J. Mol. Biol. **166**, 211-217.

LIBERMAN, Y.A. & TOPALY, V.P. (1969). *Permeability of bimolecular phospholipid membranes for fat soluble ions*. Biophysics **14**, 477-487.

LUBIN, B., CHIU, D., BASTACKY, J., ROELOFSON, B. & VAN DEENEN, L.L.M. (1981). *Abnormalities in membranes phospholipid organization in sickled erythrocytes*. J. Clin. Invest. **67**, 1643-1649.

LUKACS, G.L. & MOCZYDLOWSKI, E. (1991). *A chloride channel from lobster walking leg nerves: characterization of single-channel properties in planar bilayers*. J. Gen. Physiol. **96**, 707-733.

LUNDSTROM, I. (1977). *Electrostatic potentials in membranes due to adsorbed charges and dipoles*. Int. J. Quant. Chem. **XII**, 139-147.

LYKLEMA, J. (1968). *The structure of the electrical double layer on porous surfaces*. J. Electroanal. Chem. **18**, 341-348.

MACDONALD, R.C. (1976). *Energetics of permeation of a thin lipid membrane by ions*. Biochim. Biophys. Acta **448**, 193-198.

MAGUIRE, P.A., PRUDHOMME, J. & SHERMAN, I.W. (1991). *Alterations in erythrocyte membrane phospholipid organization due to the intracellular growth of the human malaria parasite, Plasmodium falciparum*. Parasitology. **102**, 179-186.

MATSUMOTO, M. & KATAOKA, Y. (1988). *Study on liquid-vapor interface of water. I. Simulation results of thermodynamic properties and orientational structure*. J. Chem. Phys. **88**, 3233-3245.

MATTHEWS, G.G. (1986). Cellular Physiology of Nerve and Muscle Boston: Blackwell Scientific Publications, 207 p.

MAZLIAK, P. (1987) Les modèles moléculaires des biomembranes Paris: Hermann 135 p.

MCEVOY, L., WILLIAMSON, P. & SCHLEGEL, R.A. (1986). *Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages*. Cell Biol. **83**, 3311-3315.

MCINTOSH, T.J., SIMON, S.A. & DILGER, J.P. (1989) *Location of the water-hydrocarbon interface in lipid bilayers*. In Water Transport in Biological Membranes Vol. I. Benga, G. (éd.). Boca Raton: CRC Press, pp.1-15.

MCLAUGHLIN, S.G.A. (1973). *Salicylates and phospholipid bilayer membranes*. Nature (Lond.) **243**, 234-236.

MCLAUGHLIN, S.G.A. (1977). *Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces*. In Current Topics in Membrane and Transport Vol.9. Bronner, F. & Kleinzeller, M. (éds). New York: Academic Press, pp. 71-144.

MCLAUGHLIN, S.G.A. (1989). *The electrostatic properties of membranes*. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **18**, 113-136.

MCLAUGHLIN, S.G.A., MULRINE, N., GRESALFI, T., VAIO, G. & MCLAUGHLIN, A. (1981). *Adsorption of divalent cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine*. J. Gen. Physiol. **77**, 445-473.

MCLAUGHLIN, S.G.A., SZABO, G., EISENMAN, G. & CIANI, S.M. (1970). *Surface charge and the conductance of phospholipid membranes*. Proc. Natl Acad. Sci. **67**, 1268-1275.

MELNIK, E., LATORRE, R., HALL, J.E. & TOSTESON, D.C. (1977). *Phloretin-induced changes in ion transport across lipid bilayer membranes*. J. Gen. Physiol. **69**, 243-257.

MERKEL, R., SACKMANN, E. & EVANS, E. (1989). *Molecular friction and epitactic coupling between monolayers in supported bilayers*. J. Phys. France **50**, 1535-1555.

MICHAELSON, D.M., BARKAI, G. & BARENHOLZ, Y. (1983). *Asymmetry of lipid organization in cholinergic synaptic vesicle membranes*. Biochem. J. **211**, 155-162.

MILJANICH, G.P., NEMES, P.P., WHITE, D.L. & DRATZ, E.A. (1981). *The asymmetric transmembrane distribution of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine & fatty acids of the bovine retinal rod outer segment disk membrane.* J. Membrane Biol. **60**, 249-255.

MINGINS, J. & PETHICA, B.A. (1961). Surface Phenomena in Disperse Systems. Unilever Research Symposium.

MOHWALD, H. (1990). *Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface.* Ann. Rev. Phys. Chem. **41**, 441-476.

MONTAL, M. & MUELLER, P. (1972). *Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **69**, 3561-3566.

MONTAL, M. (1974). *Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers.* In Methods in Enzymology XXXII, Biomembranes Part B. Fleischer, S. & Packer, L. (éds). New York: Academic Press, pp. 545-554.

MORF, W.E. (1981). The Principles of Ion Selective Electrodes and of Membrane Transport, Chap. 8. Amsterdam: Elsevier, pp. 113-152.

MORROT, G., CRIBIER, S., DEVAUX, P.F., GELDWERTH, D., DAVOUST, J., BUREAU, J.F., FELLMANN, P., HERVE, P. & FRILLEY, B. (1986). *Asymmetric lateral mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**, 6863-6867.

MOZAFFARY, H. (1991). *On the sign and origin of the surface potential of phospholipid monolayers.* Chem. Phys. Lip. **59**, 39-47.

MULLER, C.P. & KRUEGER, G.R.F. (1986). *Modulation of membrane proteins by vertical phase separation and membrane lipid fluidity: basis for a new approach to tumor immunotherapy.* Anticancer Research. **6**, 1181-1194.

MUNSTER, A. (1974). Statistical Thermodynamics Vol. II, Chap. XVIII. New York: Academic Press.

NEHER, E. & SAKMANN, B. (1976). *Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.* Nature (Lond.) **260**, 799-802.

NELSON, A.P., COLONOMOS, P. & MCQUARRIE, D.A. (1975). *Electrostatic coupling across a membrane with titratable surface groups.* J. Theor. Biol. **50**, 317-325.

NELSON, A.P. & MCQUARRIE, D.A. (1975). *The effect of discrete charges on the electrical properties of a membrane*. J. Theor. Biol. **55**, 13-27.

NEUMCKE, B. & LAUGER, P. (1969). *Nonlinear electrical effects in lipid bilayer membranes. II. Integration of the generalized Nernst-Planck equations*. Biophys. J. **9**, 1160-1170.

NILES, W.D., LEVIS, R.A. & COHEN, F.S. (1988). *Planar bilayer membranes made from phospholipid monolayers form by a thinning process*. Biophys. J. **53**, 327-335.

OHKI, S. (1985). *The origin of electrical potential in biological systems*. In Comprehensive Treatise of Electrochemistry Vol. 10. Srinivasan & coll. (éds). New York: Plenum Press, pp. 1-130.

OHKI, S. & KURLAND, R. (1981). *Surface potential of phosphatidylserine monolayers: II. Divalent and monovalent ion binding*. Biochim. Biophys. Acta **645**, 170-176.

OHSHIMA, H., HEALY, T.W. & WHITE, L.R. (1982). *Accurate analytic expressions for the surface charge density/surface potential relationship and double layer potential distribution for a spherical colloidal particle*. J. Colloid Interface Sci. **90**, 17-26.

OP DEN KAMP, J.A.F. (1979) *Lipid asymmetry in membranes*. Ann. Rev. Biochem. **48**, 47-71.

OSTRO, M.J. (1987). Liposomes: From Biophysics to Therapeutics New York: Marcel Dekker.

OUTHWAITE, C. & BHUIYAN, L.B. (1983). *An improved modified Poisson-Boltzmann equation in electric double-layer theory*. J. Chem. Soc. Faraday Trans. II **79**, 707-718.

OVERBEEK, J.Th.G. & LIJKLEMA, J. (1959). *Electric potentials in colloidal systems*. In Electrophoresis: Theory, Methods and Applications Vol. 1. Bier, M. (éd.). New York: Academic Press, pp. 1-33.

PAQUIN, P. (1983). Propriétés électriques de membranes asymétriques: réalisation de l'instrumentation et application à l'étude de la membrane discale Thèse de doctorat. Université de Sherbrooke, 96 p.

PARSEGIAN, V.A. (1969). *Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems*. Nature (Lond.) **221**, 844-846.

PARSEGHIAN, V.A. (1975). *Ion-membrane interactions as structural forces*. Ann. N.Y. Acad. Sci. **264**, 161-174.

PARSONS, R. (1954). *Equilibrium properties of electrified interphases*. In Modern Aspects of Electrochemistry, Vol. 1, Bockris, J.O'M. (éd.). Londres: Butterworths, pp. 103-179.

PASTUSHENKO, V.F. (1984). *Problem of the polaron mechanism of the background conductivity of bilayer lipid membranes*. Biophysics **29**, 72-75.

PAVLOV, P. & KHOLKOV, A. (1989). Physique du solide. Moscou: Mir. 415 p.

PAWLAK, M., STANKOWSKI, S. & SCHWARZ, G. (1991). *Mellitin induced voltage-dependent conductance in DOPC lipid bilayers*. Biochim. Biophys. Acta **1062**, 94-102.

PERIN, M.S. & MACDONALD. (1989). *Interactions of liposomes with planar bilayer membranes*. J. Membrane Biol. **109**, 221-232.

PERRET, B., CHAP, H.J. & DOUSTE-BLAZY, L. (1979). *Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation*. Biochim. Biophys. Acta **556**, 434-446.

PESCHKE, J., RIEGLER, J. & MOHWALD, H. (1987). *Quantitative analysis of membrane distortions induced by mismatch of protein and lipid hydrophobic thickness*. Eur. Biophys. J. **14**, 385-391.

PICARD, G., DENICOURT, N. & FENDLER, J.H. (1991). *Simultaneous electrical and optical interferometric measurements of pressure- and applied potential-induced bilayer lipid membrane deformation*. J. Phys. Chem. **95**, 3705-3715.

PICKAR, A.D. & AMOS, W.D. (1976). *Alternating current studies of charge carrier transport in lipid bilayers: pentachlorophenol in lecithin-cholesterol membrane*. Biochim. Biophys. Acta **455**, 36-55.

PICKAR, A.D. & BENZ, R. (1977). *Transport of oppositely charged lipophilic probe ions in lipid bilayer membranes having various structures*. J. Membrane Biol. **44**, 353-376.

PICKAR, A.D. & BROWN, W.C. (1983). *Capacitance of bilayers in the presence of lipophilic ions*. Biochim. Biophys. Acta **733**, 181-185.

PICKARD, W.F., SEHGAL, K.C. & JACKSON, C.M. (1979). *Measurement of phospholipid monolayer surface potentials at a hydrocarbon-electrolyte interface*. Biochim. Biophys. Acta **552**, 1-10.

PISKOUNOV, N (1985). Calcul différentiel et intégral Tome 1. Moscou: Mir. 511 p.

PLAISANCE, M. & TER-MINASSIAN-SARAGA, L. (1970). *Méthode de mesure différentielle du potentiel de surface*. C.R. Acad. Sc. Paris **C270**, 1269-1272.

POST, J.A., LANGER, G.A. & OP DEN KAMP, J.A.F. (1988). *Phospholipid asymmetry in cardiac sarcolemma. Analysis of intact cells and 'gas-dissected' membranes*. Biochim. Biophys. Acta **943**, 256-266.

POWELL, K.T. & WEAVER, J.C. (1986). *Transient aqueous pores in bilayer membranes: a statistical theory*. Bioelectrochem. Bionerg. **13**, 211-227.

PUSKIN, J.S. & COENE, M.T. (1980). *Na⁺ and H⁺ dependent Mn²⁺ binding to phosphatidylserine vesicles as a test of the Gouy-Chapman-Stern theory*. J. Membrane Biol. **52**, 69-74.

PYATNITSKII, A.M. & AKIMOV, V.N. (1986). *Mechanical fluctuations of the lipid bilayer surface*. Biophysics **31**, 259-267.

QUINTIN, M. (1970). Electrochimie Paris: Presses Universitaires de France, 544 p.

RALSTON, A. & RABINOWITZ, P. (1978). A First Course in Numerical Analysis. 2^e édition. New York: McGraw-Hill, 556 p.

RAND, R.P. & PARSEGIAN, V.A. (1989). *Hydration forces between phospholipid bilayers*. Biochim. Biophys. Acta **988**, 351-376.

RANJAGARAN, S.K. (1963). *Diffusion with migration in the diffuse double layer*. Can. J. Chem. **41**, 983-994.

RAUCH, G., GAMBALE, F. & MONTAL, M. (1990). *Tetanus toxin channel in phosphatidylserine planar bilayers: conductance states and pH dependance*. Eur. Biophys. J. **18**, 79-83.

REEVES, R. (1980). *The double layer in the absence of specific adsorption*. In Comprehensive Treatise of Electrochemistry Vol. 1, Bockris, J.O'M., Conway, B.E. & Yeager, E. (éds). New York: Plenum Press, pp. 83-134.

REQUENA, J. & HAYDON, D.A. (1975). *Van der Waals forces in oil-water systems from the study of thin lipid films. II. The dependance of the van der Waals free energy of thinning on film composition and structure.* Proc. R. Soc. Lond. A **347**, 226-233.

REYES, J., ALLEN, J., TANPHAICHITR, N., BELLVÉ, A.R. & BENOS, D.J. (1984). *Molecular mechanisms of gossypol action on lipid membranes.* J. Biol. Chem. **259**, 9607-9615.

REYES, J. & BENOS, D.J. (1984). *Changes in interfacial potentials induced by carbonylcyanide phenylhydrazone uncouplers: possible role in inhibition of mitochondrial oxygen consumption and other transport processes.* Membr. Biochem. **5**, 243-268.

REYNOLDS, J.A., GILBERT, D.B. & TANFORD, C. (1974). *Empirical correlation between hydrophobic free energy and aqueous cavity.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **71**, 2925-2927.

ROBERT, S. & TANCREDE, P. (1991). *The electrical and spectroscopic properties of planar asymmetrical membranes incorporating chlorophyll a and plastoquinone-9. Model of incorporation of chlorophyll a and plastoquinone-9.* Biochem. Cell Biol. **69**, 42-48.

ROBERT, S., TANCREDE, P., HOULE, A. & LEBLANC, R.M. (1985). *Electrical and emission properties of chlorophyll a in planar asymmetrical membranes.* Photochem. Photobiol. **41**, 101-106.

ROBERTS, G.G. (1984). *Langmuir-Blodgett films.* Contemp. Phys. **25**, 109-128.

ROJAS, E. & POLLARD, H.B. (1987). *Membrane capacity measurements suggest a calcium-dependent insertion of synexin into phosphatidylserine bilayers.* FEBS Lett. **217**, 25-31.

RUBIN, B.T. & BARBER, J. (1980). *The role of membrane surface charge in the control of photosynthetic processes and the involvement of electrostatic screening.* Biochim. Biophys. Acta **592**, 87-102.

SACKMANN, E. (1983). *Physical foundations of the molecular organization and dynamics of membranes.* In Biophysics. Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. & Ziegler, H. (Éds). New York: Springer-Verlag, pp.425-457.

SAUVÉ, R. & OHKI, S. (1979). *Interactions of divalent cations with negatively charged membrane surfaces: I. Discrete charge potential.* J. Theor. Biol. **81**, 157-179.

SCHERER, J.R. (1989). *On the position of the hydrophobic/hydrophilic boundary in lipid bilayers*. Biophys. J. **55**, 957-964.

SCHINDLER, H. (1989). *Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and of detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions*. Meth. Enzymol. **171**, 225-253.

SCHOCH, P., SARGENT, D.F. & SCHWYZER, R. (1979). *Capacitance and conductance tools for the measurement of asymmetric surface potentials and energy barriers of lipid bilayer membranes*. J. Membrane Biol. **46**, 71-89.

SCHROEDER, F. (1984). *Role of membrane lipid asymmetry in aging*. Neurobiology of Aging **5**, 323-333.

SCHROEDER, F., GORKA, C. & GIBSON WOOD W. (1988) *Neuronal Membrane asymmetry and aging*. In Central Nervous System Disorders of Aging: Clinical Intervention and Research Strong, R. et al. (éds). New York: Raven Press, pp. 211-222.

SEIGNEURET, M., ZACHOWSKI, A., HERMANN, A. & DEVAUX, P.F. (1984). *Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin label evidence*. Biochemistry **23**, 4271-4275.

SHEETZ, M.P. & SINGER, S.J. (1974). *Biological membranes as bilayer couples, A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. **71**, 4457-4461.

SHINITZKY, M. (1987). *The lipid regulation of receptor functions*. In Biomembrane and Receptor Mechanisms Bertoli, E., Chapman, B., Cambria, A. & Scapagnini, U. (éds). Padoue: Liviana Press, pp. 135-141.

SILVA, M.T. (1983). *The use of transmission electron microscopy of ultrathin sections for the characterization of the ultrastructure of normal and damaged bacterial membranes*. In Biomembranes: Dynamics and Biology. Burton & Guerra (éds). pp 1-33.

SIMON, S.A. & MCINTOSH, T.J. (1986). *Depth of water penetration into bilayers*. Meth. Enzymol. **127**, 511-521.

SIMON, S.A. & MCINTOSH, T.J. (1989). *Magnitude of the solvation pressure depends on dipole potential*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A **86**, 9263-9267.

SIMON, S.A., MCINTOSH, T.J. & LATORRE, R. (1982). *Influence of cholesterol on water penetration into bilayers*. Science **216**, 65-67.

SINGER, S.J. (1974). *On the fluidity and asymmetry of biological membranes*. In Perspectives in Membrane Biology. New York: Academic Press, pp. 131-147.

SINGER, S.J. & NICOLSON, G.L. (1972). *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science* **175**, 720-731.

SINHA, B.A. & SMEJTEK, P. (1983). *Effect of 3-phenylindole on lipophilic ion and carrier-mediated ion transport across bilayer lipid membranes*. *J. Membrane Biol.* **71**, 119-130.

SIVOUKHINE, D. (1982). Cours de physique générale Tome I: Mécanique. Moscou: Mir. 552 p.

SIVOUKHINE, D. (1983). Cours de physique générale Tome III: Electricité. Moscou: Mir. 719 p.

SLATIN, S.L. (1988). *Colicin E1 in planar lipid bilayers*. *J. Biochem.* **20**, 737-744.

SMEJTEK, P. & PAULIS-ILLANGASEKARE, M. (1979). *Modification of ion transport in lipid bilayer membranes in the presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. II. Suppression of tetraphenylborate conductance and changes of interfacial potentials*. *Biophys. J.* **26**, 467-488.

SPITZER, J.J. (1983). *The effect of ionic sizes on the potential distribution in the double layer in the absence of specific adsorption*. *J. Colloid Interface Sci.* **92**, 198-203.

STARK, G. (1978). *Carrier-mediated ion transport across thin lipid membranes*. In Membrane Transport in Biology, Vol. I. Giebisch, G., Tosteson, D.C. & Ussing, H.H. (éds). New York: Springer-Verlag, pp. 447-473.

STARK, G. & BENZ, R. (1971). *The transport of potassium through lipid bilayer membranes by the neutral carriers valinomycin and monactin*. *J. Membrane Biol.* **5**, 133-153.

STEN-KNUDSEN. (1978). *Passive transport processes*. In Membrane Transport in Biology, Vol. I. Giebisch, G., Tosteson, D.C. & Ussing, H.H. (éds). New York: Springer-Verlag, pp. 5-113.

STERN, O. (1924). *Zur theorie der elektrolytischen doppelschicht*. *Z. Elektrochem.* **30**, 508-516.

STILLINGER, F.H. & KIRKWOOD, J.G. (1960). *The theory of diffuse double layer*. J. Chem. Phys. **33**, 1282-1290.

STRITCHARTZ, G.R., OXFORD, G.S. & FAMON, F. (1980). *Effects of the dipolar form of phloretin on potassium conductance in squid giant axons*. Biophys. J. **31**, 229-246.

SZABO, G. (1974). *Dual mechanism for the action of cholesterol on membrane permeability*. Nature (Lond.) **252**, 47-49.

SZABO, G. (1976). *The influence of dipole potential on the magnitude and the kinetics of ion transport in lipid bilayer membranes*. In Extreme Environnement : Mechanisms of Microbial Adaptation. Heinrich, M.R. (éd.). New York: Academic Press, pp. 321-348.

SZABO, G., EISENMAN, G., MCCLAUGHLIN, S.G.A. & KRASNE, S. (1972). *Ionic probes of membrane structures*. Ann. N.Y. Acad. Sci. **195**, 273-290.

SZABO, G. WALDBILLIG, R.C. (1982). *Lipid model membranes*. Methods of Experimental Physics **20**, 513-543.

SZOKA, F. & PAPAHAJDIOPOULOS, D. (1980). *Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)*. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **9**, 467-508.

TANCREDE, P., PAQUIN, P., HOULE, A & LEBLANC, R.M. (1983). *Formation of asymmetrical planar lipid bilayer membranes from characterized monolayers*. J. Biochem. Biophys. Meth. **7**, 299-310.

THOMPSON, M. & KRULL, U.J. (1983). *Lipid membrane dipole perturbation and chemoreception as models for selective chemical sensing*. Anal. Chim. Acta **147**, 1-21.

TOCANNE, J.F. & TEISSIÉ, J. (1990). *Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems*. Biochim. Biophys. Acta **1031**, 111-142.

TOSTESON, M.T. & TOSTESON, D.C. (1978). *Bilayers containing gangliosides develop channels when exposed to cholera toxin*. Nature (Lond.) **275**, 142-144.

TOSTESON, M.T. & WIETH, J.O. (1979). *Tributyltin-mediated exchange diffusion of halides in lipid bilayers*. J. Gen. Physiol. **73**, 789-800.

TOSTESON, M.T. (1978). *Interactions between a membrane sialoglycoprotein and planar lipid bilayers*. J. Membrane Biol. **38**, 291-309.

TOYAMA, S., NAKAMURA, A. & TODA, F. (1991). *Measurement of voltage dependence of capacitance of planar bilayer lipid membrane with a patch clamp amplifier*. Biophys. J. **59**, 934-944.

TSUI, F.C., SUNDBERG, S.A. & HUBBELL, W.L. (1990). *Distribution of charge on photoreceptor disc membranes and implications for charged lipid asymmetry*. Biophys. J. **57**, 85-97.

VAN DIJK, C. & DE LEVIE, R. (1985). *An experimental comparison between the continuum and single jump descriptions of nonactin-mediated potassium transport through black lipid membranes*. Biophys. J. **48**, 125-136.

VENIEN, C. & LE GRIMMELEC, C. (1987). *Phospholipid asymmetry in renal brush border membranes*. Mineral & Electrolyte Metabolism. **13**, 357.

VENSELAAR, J.L.M., KRUGER, A.J., VERBAKEL, L.M.H. & POULIS, J.A. (1979). *The static capacitor method of measuring the effective dipole moment of surfactant molecules*. J. Colloid Interface Sci. **70**, 149-152.

VERKLEIJ, A.J., ZWAAL, R.F.A., ROELOFSEN, B., COMFURIUS, P., KASTELIJN, D. & VAN DEENEN, L.L.M. (1973). *The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy*. Biochim. Biophys. Acta **323**, 178-193.

VIK, S.B., GEORGEVI, G. & CAPALDI, R.A. (1981). *Diphosphatidyl glycerol is required for optimal activity of beef heart cytochrome-c oxidase*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. **78**, 1456-1460.

VODYANOY, I. & HALL, J.E. (1984). *Thickness dependence of monoglyceride bilayer membrane conductance*. Biophys. J. **46**, 187-194.

VODYANOY, I., HALL, J.E. & VODYANOY, V. (1988). *Alamethicin adsorption in planar lipid bilayer*. Biophys. J. **53**, 649-658.

VOLKENSTEIN, M. (1985). *Biophysique*. Moscou: Mir, 631 p.

WALZ, D., BAMBERG, B. & LAUGER, P. (1969). *Nonlinear electrical effects in lipid bilayer membranes. I. Ion injection*. Biophys. J. **9**, 1150-1159.

WEAVER, J.C., POWELL, K.T., MINTZER, R.A. (1984). *The diffusive permeability of bilayer membranes: the contribution of transient aqueous pores*. Bioelectrochem. Bioenerg. **12**, 405-412.

WEINSTEIN, J.N., BLUMENTHAL, R., VAN RENSWOUDE, J., KEMPF, C. & KLAUSNER, R.D. (1982) *Charge clusters and the orientation of membrane proteins*. J. Cell. Biochem. **22**, 55-67.

WHITE, S.H. (1970). *A study of lipid bilayer membrane stability using precise measurements of specific capacitance*. Biophys. J. **10**, 1127-1148.

WHITE, S.H. (1978). *Formation of "solvent-free" black lipid bilayer membranes from glyceryl monooleate dispersed in squalene*. Biophys. J. **23**, 337-347.

WHITE, S.H. (1986). *The physical nature of planar bilayer membranes*. In Ion Channel Reconstitution C.Miller (éd.). New York: Plenum Press, pp. 3-35.

WHITE, S.H. & BLESSUM, D.N. (1975). *High precision capacitance bridge for studying lipid bilayer membranes*. Rev. Sci. Instrum. **46**, 1462-1466.

WHITE, S.H. & KING, G.I. (1985). *Molecular packing and area compressibility of lipid bilayers*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 6532-6536.

WHITE, S.H., PETERSON, D.C., SIMON, S. & YAFUSO, M. (1976). *Formation of planar bilayer membranes from lipid monolayers. A critique*. Biophys. J. **16**, 481-489.

WIESE, G.R., JAMES, R.O., YATES, D.E. & HEALY, T.W. (1976). *Electrochemistry of the colloid-water interface*. In Electrochemistry. Physical Chemistry, Series two, Vol. 6. Bockris, J.O'M. (éd.). Londres: Butterworth, pp. 53-102.

WILMSEN, U., METHFESSEL, C., HANKE, W. & BOHEIM, G. (1983). *Channel current fluctuation studies with solvent-free lipid bilayers using Neher-Sackmann pipettes*. In Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions. Spach, G. (éd.). Amsterdam: Elsevier, pp. 479-485.

WILSON, M.A., POHORILLE, A. & PRATT, L.R. (1988). *Surface potential of the water liquid-vapor interface*. J. Chem. Phys. **88**, 3281-3285.

WILSON, M.A., POHORILLE, A. & PRATT, L.R. (1989). *Comment on "Study on the liquid-vapor interface of water. I. Simulation results of thermodynamics properties and orientational structure"*. J. Chem. Phys. **90**, 5211-5213.

WOJTCZAK, L. & NALECZ, M.J. (1985). *The surface potential of membranes: its effect on membrane-bound enzymes and transport processes*. In Structure & Properties of Cell Membranes, Vol. II: Molecular basis of selected transport systems. Benga, G. (éd.). Boca Raton: CRC Press Inc, pp. 215-242.

WOOD, W.G., GORKA, C., RAO, A.M. & SCHROEDER, F. (1989). *Specific action of ethanol on lateral and vertical membrane lipid domains*. In Molecular Mechanisms of Alcohol. Sun, G.Y. & coll. (éds). pp. 3-13.

WOODLE, M.C. & PAPAHAJOPOULOS, D. (1987). *Liposome preparation and size characterization*. Meth. Enzymol. **171**, 193-217.

WORCESTER, D.L. & FRANKS, N.P. (1976). *Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers. II. Neutron diffraction*. J. Mol. Biol. **100**, 359-378.

WRIGGLESWORTH, J.M. (1984). *Reconstituted membrane systems*. In Membrane Processes. Benga, G., Baum, H. & Kummerow, F.A. (éds). New York: Springer-Verlag, pp. 1-26.

YAKOVLEVA, N.B. & PASECHNIK, V.I. (1983). *Evaluation of the thickness of the lipid bilayer of biological membranes from measurement of specific capacitance*. Biophysics **28**, 1092-1097.

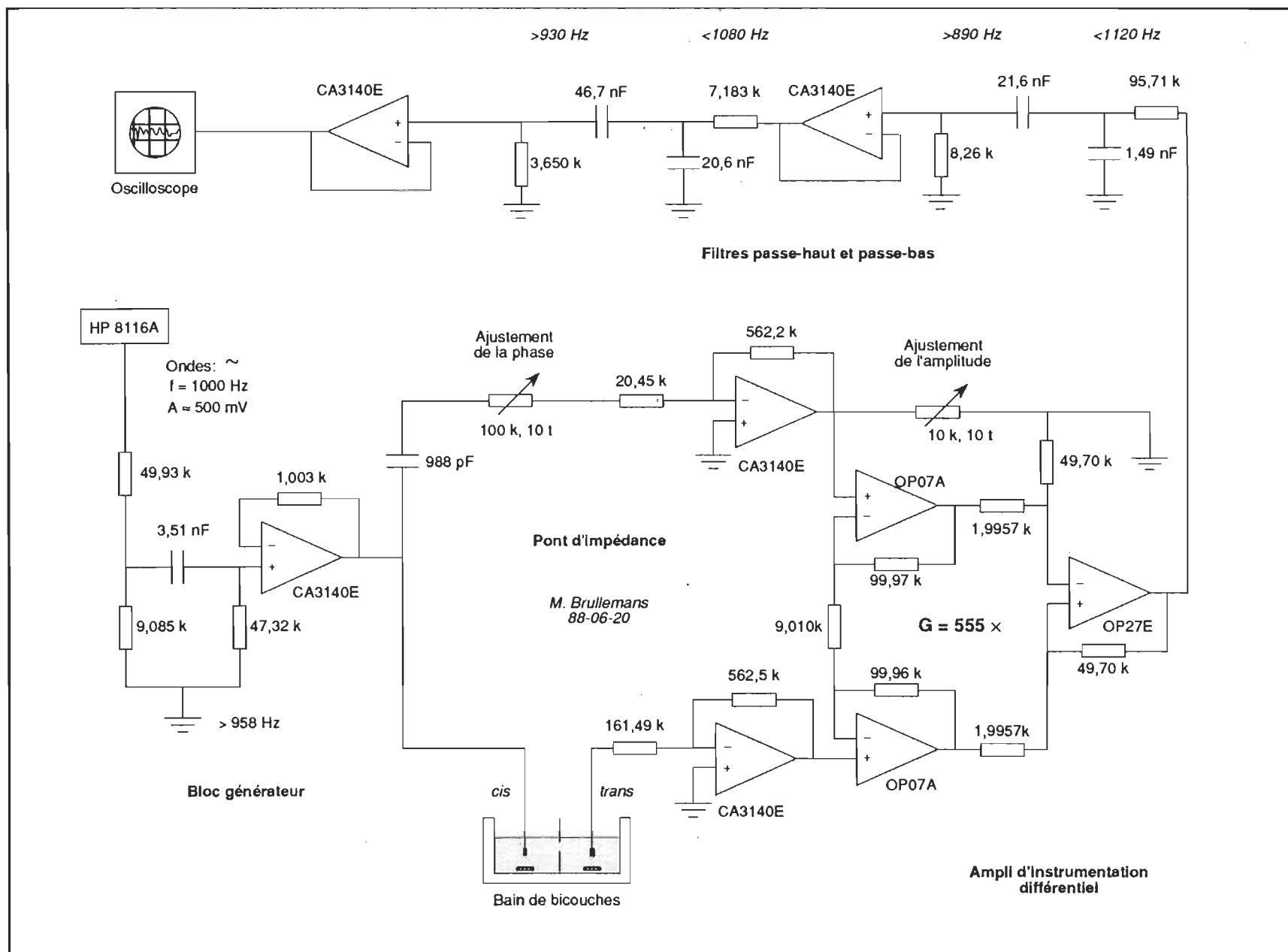
YOSHIKAWA, K., FUJIMOTO, T., SHIMOOKA, T., TERADA, H., KUMAZAWA, N. & ISHII, T. (1988). *Electrical oscillation and fluctuation in phospholipid membranes. Phospholipids can form a channel without protein*. Biophys. Chem. **29**, 293-299.

ZIEGLER, W. & PAVLOVKIN, J. (1985). *Syringotoxin, ein phytotoxin von pseudomonas syringae pv. syringae, erzeugt ionenkanäle in bimolekularen lipidmembranen*. Acta Phytopathologica Academia Scientiarum Hungaricae. **20**, 35-45.

ZIMANYI, L. & GARAB, G. (1989). *Configuration of the electric field and distribution of ions in energy transducing biological membranes: model calculations in a vesicle containing discrete charges*. J. Theor. Biol. **138**, 59-76.

ZUCKERMANN, M.J., GEORGALLAS, A. & PINK, D.A. (1985). *The effect of electrostatic interactions and water polarization on the properties of charged lipid membranes: a theoretical approach*. Can. J. Phys. **63**, 1228-1234.

ZWAAL, R.F.A. & BEVERS, E.M. (1983). *Platelet phospholipid asymmetry and its significance in hemostasis*. In Subcellular Biochemistry Vol 9. Roodyn, D.B. (éd.). New York: Plenum Press, pp. 299-334.



Annexe 1. – Circuit électronique complet ayant servi à la mesure de capacité.

ANNEXE 3 Programme d'extraction de la barrière d'énergie trapézoïdale

```

C
C
C
PROGRAM TPZIV
C
C
C
C
C
C
CHARACTER FICHIV*45,FICHEXP*45,FICHTPZ*45,FICHBIV*45,TITRE*110
INTEGER I,N,NB,NR,PP,DP,SP,
& N1MIN,N1MAX,N1INC,N2MAX,N2MIN,N2INC,N1,N2,
& SYM,W,Z,ZZ,ZZZ
REAL*8 DPHI,DPSID,PHI1,PHI1P,PHI2,PHI2P,DPHIP,V0,VD,E0,ED,E1,E2,
& LKMIN,LKMAX,LKINC,DPSIMIN,DPSIMAX,DPSIINC,DPSI,
& KNPI,LKPI,PSI1MIN,PSI1MAX,PSI1INC,PSI1,PSI2,DN,
& VR(1302),IEXP(1302),VEXP(1302),ITZ(1302),
& RI,RR,RIR,SR,SRR,RMOY,RMAX,TAU,TAUMAX,TAUMIN,
& CCI0,CCID,CIW0,CIWD,CCW0,CCWD,DCIM,GAMMA,KCIW,GKC,T,TC,
& CCIW0,CCIWD,AIRE,D,DIAM,PI,F,R,BETA,FD,FO,KNP,KNPX,SDP,
& N1X,N2X,DNX,PSI1X,PSI2X,DPSIX,NUM,DEN,I1,I2,I3,SB
C
C
WRITE(*,1009) 'Programme TPZIV - NPT Version 5','N1 et N2',
& 'M. Brullemans','9 janv. 1988'
WRITE(*,1007) 'Programme mis à jour le 12 sept. 1991'
C
7 CONTINUE
WRITE(*,1005)'Entrez le nom du fichier d"entrée (.EXP) ':'
READ (*,'(A)') FICHEXP
WRITE(*,1005)'Entrez le nom du fichier d"entrée (.IV ) ':'
READ (*,'(A)') FICHIV
WRITE(*,1005)'Entrez le nom du fichier de sortie (.TPZ) ':'
READ (*,'(A)') FICHTPZ
WRITE(*,1005)'Entrez le nom du fichier de sortie (.BIV) ':'
READ (*,'(A)') FICHBIV
C
1001 FORMAT (//,5X,A,6X,\)
1005 FORMAT (4X,A,5X,\)
1007 FORMAT (15X,A,4(/))
1009 FORMAT (//,4(4X,A),/)

```

```

C
C
      OPEN (11,FILE= FICHIV)
      OPEN (12,FILE= FICHEXP)
      OPEN (13,FILE= FICHBIV,STATUS='NEW')
      OPEN (14,FILE= FICHTPZ,STATUS='NEW')
C
C
      WRITE(*,1010)
1010 FORMAT(4(/),5X,'X.IV : TITRE, N < 1300, VEXP(mV),IEXP(A),I',/,5X,
&          'X.EXP : CIW0,CIWD,CCW0,CCWD(mol/l),KCIW(l/mol),',
&          'GAMMA,DCIM(m2/s),DIAM(um),T(°C)',/,5X,
&          'X.BIV : X.EXP + CCI0,CCID(M),D(A),PSI1,PSI2,',
&          'N1,N2,DPSID(mV),RMAX,RMOY,TAU(A)',/,5X,
&          'X.TPZ : TITRE,NR,VEXP(mV),IEXP,RI(A),RIR(%),I,CCI0,'
&          'CCID,D,PSI1,PSI2,N1,N2,DPSID,RMAX,RMOY,TAU',///)
C
C
C ----- Lecture des données -----
C
C
      READ(11,'(A)') TITRE
      WRITE(*,'(A)') TITRE
      READ(11,*) N
      WRITE(*,*) N
      DO 10 I=1,N
          READ(11,*) VEXP(I),IEXP(I)
          IF (MOD(I,10).EQ.0) WRITE(*,1022) VEXP(I),IEXP(I)
10 CONTINUE
      READ(12,*) CIW0,CIWD,CCW0,CCWD,KCIW,GAMMA,DCIM,DIAM,TC
      WRITE(*,1025) CIW0,CIWD,CCW0,CCWD
1022 FORMAT (2X,F10.3,8X,1PD13.6)
1025 FORMAT (2(2X,F10.3),2(4X,1PD9.3))
C
C -----
C
      PI = 3.1415926535
      F = 96484.56
      R = 8.31441
      T = TC + 273.15
      BETA = F/(1000.*R*T)
      D = 3.00D-9
      AIRE = 1E-12 * PI * DIAM**2 /4.
      KCIW = 4
      GAMMA = 5000
      CIW0 = CIW0*1000
      CIWD = CIWD*1000
      CCW0 = CCW0*1000
      CCWD = CCWD*1000
      GKC = GAMMA*KCIW
      CCIW0 = CIW0*CCW0
      CCIWD = CIWD*CCWD

```

```

      CCI0 = GKC*CCIW0
      CCID = GKC*CCIWD
      KNP = F*AIRE*DCIM*GKC/D
      WRITE(*,1500) KNP,CCI0,CCID
1500 FORMAT (//,2X,'KNP = ',1PD12.6,4X,'CCI0 = ',1PD9.3,' mol/m3',4X,
&          'CCID = ',1PD9.3,' mol/m3',/)
C
C
C -----
C
150 CONTINUE
      WRITE(*,1001)'Simulation en BOUCLE (1), SIMPLE (2), ou FIN (3) : '
      READ (*,*) Z
      GOTO (130,82,99) Z
130 CONTINUE
C
C
C ----- Simulation en boucle -----
C
C
      WRITE(*,1001)'Position des coins symétrique (1) ou non (2) : '
      READ(*,*) SYM
      WRITE(*,//,5X,A)' TITRE
      WRITE(*,1030) N
1030 FORMAT(7X,I5,' points')
      WRITE(*,1005)'Entrez PP DP SP (réduction du # de points) : '
      READ(*,*) PP,DP,SP
      NR = INT((DP-PP+SP)/SP)
      WRITE(*,1030) NR
      WRITE (*,/(/))
C
C
C ----- Lecture des paramètres pour la simulation -----
C
C
      WRITE(*,1001)'Entrez FO et FD pour changer CCI0 et CCID : '
      READ(*,*) FO,FD
      FO =1
      FD =1
      WRITE(*,1005)'Entrez LKMIN LKMAX LKINC (réels) : '
      READ(*,*) LKMIN,LKMAX,LKINC
      WRITE(*,1005)'Entrez PSI1MIN PSI1MAX PSI1INC en mV (réels) : '
      READ(*,*) PSI1MIN,PSI1MAX,PSI1INC
      WRITE(*,1005)'Entrez DPSIMIN DPSIMAX DPSIINC en mV (réels) : '
      READ(*,*) DPSIMIN,DPSIMAX,DPSIINC
      WRITE(*,1005)'Entrez N1MIN N1MAX N1INC sous la forme (.)ZZ : '
      READ(*,*) N1MIN,N1MAX,N1INC
      IF (SYM.NE.1) THEN
      WRITE(*,1005)'Entrez N2MIN N2MAX N2INC sous la forme (.)ZZ : '
      READ(*,*) N2MIN,N2MAX,N2INC
      ENDIF

```

```

C      IF (SYM.EQ.1) THEN
          NB = ((LKMAX-LKMIN+LKINC)/LKINC) *
&          ((PSI1MAX-PSI1MIN+PSI1INC)/PSI1INC) *
&          ((DPSIMAX-DPSIMIN+DPSIINC)/DPSIINC) *
&          ((N1MAX-N1MIN+N1INC)/N1INC)
      ELSE
          NB = ((LKMAX-LKMIN+LKINC)/LKINC) *
&          ((PSI1MAX-PSI1MIN+PSI1INC)/PSI1INC) *
&          ((DPSIMAX-DPSIMIN+DPSIINC)/DPSIINC) *
&          ((N1MAX-N1MIN+N1INC)/N1INC)*
&          ((N2MAX-N2MIN+N2INC)/N2INC)
      ENDIF
      WRITE(*,2001) NB,NR
2001 FORMAT(/,4X,'Le courant ITZ sera évalué ',I6,' ',*,I5,' fois',/)
C
      WRITE(*,1005)'Entrez le facteur de saut de boucle [ 1 à 100 ] : '
      READ(*,*) SB
C
      WRITE(*,1005)'Entrez le facteur de saut de points [ <1 ] : '
      READ(*,*) SDP
C
      WRITE(*,1005)'Entrez TAUMAX en A [ prendre ~5% *Imoy ] : '
      READ(*,*) TAUMAX
      TAUMAX = TAUMAX *1E9
C
      DO 120 I=PP,DP,SP
          VR(I) = VEXP(I)*BETA
120 CONTINUE
C
C
      W = 0.
      SR = 0.
      SRR = 0.
      RMAX = 0.
      CCI0 = CCI0*FO
      CCID = CCID*FD
      WRITE(*,1500) KNP,CCI0,CCID
      WRITE(*,1700)
1700 FORMAT (4X,'PSI1',6X,'PSI2',6X,'DPSI',8X,'N1',5X,'N2',6X,
&          'DPSID',11X,'RMAX',9X,'RMOY',9X,'TAU',9X,'KNP',/)
      WRITE(13,('A',/I5)) TITRE,NR
      WRITE(13,1040)
1040 FORMAT (2X,'CIW0',6X,'CIWD',4X,'CCW0',9X,'CCWD',10X,'KCIW',9X,
&          'GAMMA',10X,'DCIM',8X,'DIAM',7X,'T')
      WRITE(13,1050) CIW0,CIWD,CCW0,CCWD,KCIW,GAMMA,DCIM,DIAM,TC
1050 FORMAT (2X,2(F8.3,3X),5(1PD9.2,5X),2(0PF6.2,5X))
      WRITE(13,1100)
1100 FORMAT(3X,'KNP',9X,'PSI1',4X,'PSI2',4X,'DPSI',4X,'N1',4X,'N2',4X,
&          'DPSID',7X,'RMAX',9X,'RMOY',9X,'TAU')
C
C

```

```

C ----- Boucle principale -----
C
C
  TAUMIN = 10 * TAUMAX
  DO 70 LKPI = LKMIN,LKMAX,LKINC
    KNPI = 10**LKPI*KNP
    WRITE(*,*) LKPI,KNPI
    DO 60 PSI1=PSI1MIN,PSI1MAX,PSI1INC
      PHI1 = PSI1*BETA
      DO 40 DPSI=DPSIMIN,DPSIMAX,DPSIINC
        PSI2 = DPSI+PSI1
        PHI2 = PSI2*BETA
        DPHI = PHI2 -PHI1
        DO 30 N1 = N1MIN,N1MAX,N1INC
          IF (SYM.EQ.1) N2MIN = 100-N1
          IF (SYM.EQ.1) N2MAX = 100-N1
          IF (SYM.EQ.1) N2INC = 1
          DO 27 N2 = N2MIN,N2MAX,N2INC
            ZZ=0.
            DO 20 I=PP,DP,SP
              ZZ = ZZ + 1
              V0 = VR(I)
              VD = 0
              E0 = EXP(V0)
              ED = EXP(VD)
              PHI1P = PHI1+N1/100.*(VD-V0)+V0
              PHI2P = PHI2+N2/100.*(VD-V0)+V0
              DPHIP = PHI2P-PHI1P
              DN = N2/100.-N1/100.
              DPSID = DPSI/((N2/100.)-(N1/100.))
              E1 = EXP(PHI1P)
              E2 = EXP(PHI2P)
C
C          IF (ABS(PHI1P-V0).LT.1E-7) THEN
C            I1 = N1/100.*E0*(1+(PHI1P-V0)/2+(PHI1P-V0)*(PHI1P-V0)/6)
C          ELSE
C            I1 = N1/100./(PHI1P-V0)*(E1-E0)
C          ENDIF
C
C          IF (ABS(DPHIP).LT.1E-7) THEN
C            I2 = DN*E1*(1+DPHIP/2+DPHIP*DPHIP/6)
C          ELSE
C            I2 = (DN/DPHIP)*(E2-E1)
C          ENDIF
C
C          IF (ABS(PHI2P-VD).LT.1E-7) THEN
C            I3 = (1-N2/100.)*ED*(1+(PHI2P-VD)/2+(PHI2P-VD)*(PHI2P-VD)/6)
C          ELSE
C            I3 = ((1-N2/100.)/(PHI2P-VD))*(E2-ED)
C          ENDIF
C
C          NUM = KNPI * (CCIW0*E0-CCIWD*ED)

```

```

DEN = I1 + I2 + I3
IF (ABS(DEN).LT.1E-20) DEN = 1E-20
ITZ(I) = 1E9 * (NUM / DEN)

C
C
C
ICENT = NUM/(DEN-I1-I3)

RI = 1E+9*IEXP(I)-ITZ(I)
IF (ABS(RI).GT.RMAX) RMAX= ABS(RI)
RR = RI*RI
SR = SR + ABS(RI)
SRR = SRR + RR
IF (ZZ.LT.INT(NR*SDP)) GOTO 13
IF((SR/ZZ).GT.(250*TAUMAX/SB)) GOTO 25
IF((SRR/ZZ).GT.(380*TAUMAX/SB)) GOTO 25
13 CONTINUE
20 CONTINUE
RMOY = SR/NR
TAU = SQRT(SRR/NR)
IF (TAU.LT.TAUMIN) TAUMIN = TAU
IF (TAU.GT.TAUMIN) GOTO 23
WRITE (*,2300) PSI1,PSI2,DPSI,N1/100.,N2/100.,DPSID,
& RMAX*1E-9,RMOY*1E-9,TAU*1E-9,KNPI
2300 FORMAT (2X,3(F7.2,4X),2(F4.2,2X),2X,F8.2,5X,
& 3(1PD9.3,5X),1PD12.6)
23 IF (TAU.GT.TAUMAX) GOTO 25
WRITE(13,3000) KNPI,PSI1,PSI2,DPSI,N1/100.,
& N2/100.,DPSID,RMAX*1E-9,RMOY*1E-9,TAU*1E-9
3000 FORMAT (1PD12.6,2X,3(0PF7.2,3X),2(0PF4.2,3X),F7.2,
& 4X,3(1PD10.4,3X))
W = W +1
25 CONTINUE
SR = 0.
SRR = 0.
RMAX = 0.
27 CONTINUE
30 CONTINUE
40 CONTINUE
60 CONTINUE
70 CONTINUE

C
CCIO = CCIO/FO
CCID = CCID/FD
WRITE(13,*) W
WRITE(13,*) TAUMAX*1E-9
WRITE(13,*) LKMIN,LKMAX,LKINC
WRITE(13,*) PSI1MIN,PSI1MAX,PSI1INC
WRITE(13,*) DPSIMIN,DPSIMAX,DPSIINC
WRITE(13,*) N1MIN,N1MAX,N1INC
WRITE(13,*) N2MIN,N2MAX,N2INC

C
C

```

```

      GOTO 150
82  CONTINUE
C
C
C ----- Simulation en simple -----
C
C
      WRITE(*, '(//,5X,A)') TTITRE
      WRITE(*,1030) N
      WRITE(*,1005)'Entrez PP DP SP (réduction du # de points) : '
      READ(*,*) PP,DP,SP
      NR = INT((DP-PP+SP)/SP)
      WRITE(*,1030) NR
      WRITE(14, '(A,/,I5)') TTITRE,NR
      WRITE (*,1101) KNP,CCIWO,CCIWD
1101 FORMAT (/,3(1PD12.6,3X))
C
      DO 85 I=1,N
          VR(I) = VEXP(I) * BETA
85  CONTINUE
C
      WRITE(*,1111)'Entrez KNP, ',
&                ' PSI1 et PSI2 (mV), N1 et N2 (.ZZZ) : '
1111 FORMAT (/,5X,A,A,/,20X)
      READ (*,*) KNPX,PSI1X,PSI2X,N1X,N2X
C
      DPSIX = PSI2X-PSI1X
      DNX = N2X-N1X
      PHI1 = PSI1X*BETA
      PHI2 = PSI2X*BETA
      DPHI = PHI2-PHI1
      DPSID = DPSIX/DNX
C
      SR = 0.
      SRR = 0.
      RMAX = 0.
      DO 90 I=PP,DP,SP
          V0 = VR(I)
          VD = 0
          E0 = EXP(V0)
          ED = EXP(VD)
          PHI1P = PHI1+N1X*(VD-V0)+V0
          PHI2P = PHI2+N2X*(VD-V0)+V0
          E1 = EXP(PHI1P)
          E2 = EXP(PHI2P)
          DPHIP = PHI2P-PHI1P
C
      IF (ABS(PHI1P-V0).LT.1E-8) THEN
          I1 = N1X*E0*(1+(PHI1P-V0)/2+(PHI1P-V0)*(PHI1P-V0)/6)
          WRITE (*,*) I1
      ELSE
          I1 = N1X/(PHI1P-V0)*(E1-E0)

```



```

      ENDIF
C
      IF (ABS(DPHIP).LT.1E-8) THEN
        I2 = DNX*E1*(1+DPHIP/2+DPHIP*DPHIP/6)
        WRITE (*,*) DPHIP,I2,(DNX/DPHIP)*(E2-E1)
      ELSE
        I2 = (DNX/DPHIP)*(E2-E1)
      ENDIF
C
      IF (ABS(PHI2P-VD).LT.1E-8) THEN
        I3 = (1-N2X)*ED*(1+(PHI2P-VD)/2+(PHI2P-VD)*(PHI2P-VD)/6)
        WRITE (*,*) I3
      ELSE
        I3 = ((1-N2X)/(PHI2P-VD))*(E2-ED)
      ENDIF
C
      NUM = KNPX * (CCIW0*E0-CCIWD*ED)
      DEN = I1 + I2 + I3
      ITZ(I) = 1E9* (NUM/DEN)
      RI = 1E+9*IEXP(I)-ITZ(I)
      RIR = 100.*ABS(RI)/(1E9*IEXP(I))
      IF (ABS(RI).GT.RMAX) RMAX= ABS(RI)
      RR = RI*RI
      SR = SR + ABS(RI)
      SRR = SRR + RR
      WRITE (14,5000) VEXP(I),IEXP(I),ITZ(I)*1E-9,RI*1E-9,RIR,I
      WRITE (*,5000) VEXP(I),IEXP(I),ITZ(I)*1E-9,RI*1E-9,RIR,I
90  CONTINUE
      RMOY = SR/NR
      TAU = SQRT(SRR/NR)
C
      WRITE (*,3300) PSI1X,PSI2X,DPSIX,N1X,N2X,DPSID,
&      RMAX*1E-9,RMOY*1E-9,TAU*1E-9
      WRITE (14,4000) KNPX,CCIW0,CCIWD,PSI1X,PSI2X,N1X,N2X,DPSID,
&      RMAX*1E-9,RMOY*1E-9,TAU*1E-9
3300 FORMAT (//,5X,3(F8.3,5X),2(F5.3,3X),F8.3,4X,
&      3(1PD9.3,5X))
4000 FORMAT(1PD12.6,5X,2(1PD9.3,5X),2(0PF8.3,4X),2(F5.3,4X),
&      F8.3,4X,3(1PD10.4,4X))
5000 FORMAT (2X,F10.3,8X,3(1PD13.6,8X),1PD10.3,8X,I5)
      WRITE(14,1030) NR
C
      GOTO 150
99  CONTINUE
C
C
C -----
C
C
      REWIND 11
      REWIND 12
      REWIND 13

```

```
      REWIND 14
C
      WRITE (*,10000)
10000 FORMAT(//,5X,'Voulez-vous simuler d"autres courbes I-V  ?',
&          /,10X,'Tapez 0 pour oui, 1 pour non :      ',\ )
      READ (*,*) ZZZ
      IF (ZZZ.EQ.0) GOTO 7
C
      WRITE (*,20000)
20000 FORMAT (5(/,15X,'Fin  programme  TPZIV',///)
      CLOSE (11)
      CLOSE (12)
      CLOSE (13)
      CLOSE (14)
C
C
      END
C
C
```

Influence of torus on the capacitance of asymmetrical phospholipid bilayers

Marc Brullemans and Pierre Tancrède

University of Quebec, Photobiophysics Research Center, P.O. Box 500, Trois-Rivières, Québec G9A 5H7, Canada

Received 22 December 1986

Revised manuscript received 4 February 1987

Accepted 5 May 1987

Asymmetrical membrane; Hydrophobic thickness; Capacitance measurement

We have measured the specific capacitance of phosphatidylethanolamine/phosphatidylserine membranes formed from monolayers. The membranes were built across Teflon films whose thickness varied from 6 to 25 μm . The building up of the membranes was followed by recording the capacitance of the membranes during the entire process of their formation. It is observed that the specific capacitance increases by about 10% as the thickness of the film is increased. Furthermore, during formation of the membrane it is observed that the capacitance values increased markedly immediately before the membranes are completely formed and then suddenly decrease to their normal values when formed (closing-off phenomenon). These results have led us to propose that the transition region known to surround membranes formed from monolayers may affect the capacitance values measured for such membranes. However, this effect is indirect in the sense that the composition (most likely in the form of inverted micelles) of the transition region will ultimately modify the hydrophobic/hydrophilic barrier in the bilayer by affecting the lateral tension known to exist in such membranes and, as a consequence, the average molecular area occupied by a phospholipid molecule in the bilayer. By such a mechanism, one can rationalize our experimental finding that the membrane capacitance varies as a function of the partition thickness across which they are prepared. It also rationalizes the large fluctuations in capacitance values usually found in the literature for such membranes as well as, at least in part, the closing-off phenomenon.

1. Introduction

Studies on reconstituted planar membranes have deepened our understanding of a number of membrane phenomena to a large extent, particularly those related to transport processes. In this aspect, much is owed to the development of the black lipid membrane (BLM) methodology [1] or the more recent Montal-Mueller membrane reconstitution technique [2]. Indeed, these two techniques allow easy measurement of the electrical properties (e.g., specific capacitance and resistance) of the lipid bilayer, no restrictions being

imposed on the accessibility of the aqueous phases on the two sides of the bilayer*. The Montal-Mueller technique, however, bears the additional advantage that planar asymmetrical bilayers can be formed, the bilayers being prepared by apposition of two monolayers of possibly different composition. This is actually an important improvement in biomembrane methodology if one is interested in studying, for example, the role of lipid asymmetry in the generation of transmembrane potential [3].

* In this paper, we follow the convention proposed by Smith et al. [29] to refer to a membrane as designating the entire area of the lipid film across the hole in the septum, including any transition region linking the membrane to the septum. Bilayer refers to the regions of the membrane that are two molecules thick.

Correspondence address: P. Tancrède, University of Quebec, Photobiophysics Research Center, P.O. Box 500, Trois-Rivières, Québec G9A 5H7, Canada

The present work deals more specifically with capacitance measurements of Montal-Mueller membranes. This type of measurement on reconstituted planar membranes has been used quite extensively in the past to study a number of membrane-related phenomena (e.g., refs. 4–10). However, there is an inherent weakness in measurements of the electrical properties of membranes. These measurements are indeed made on a system that is actually much larger than the bilayer of interest, comprising the transition zone (also called the torus or Plateau-Gibbs border) between the bilayer and the solid support (Teflon), the support itself, the troughs, the aqueous solutions on the two sides of the membrane and the electrodes. The electrical properties of the latter four components are easily measured but if the actual electrical characteristics of a given bilayer are to be determined, one must have a knowledge of how the transition zone affects the properties measured for the membrane. It is now indeed clear, as White et al. [11] have shown, that such a transition zone is present in Montal-Mueller membranes, although the overall volume of the transition is much less important than with BLM. Otherwise, the membranes would not be stable.

The aim of this work is to provide experimental evidence that this transition zone does influence the capacitance values measured for Montal-Mueller membranes. Phosphatidylethanolamine (PE)/phosphatidylserine (PS) membranes were formed across Teflon partitions of various thicknesses. It is found that the specific capacitance measured for the membranes depends significantly on the thickness of the partition. Furthermore, the capacitance values exhibit rather large fluctuations for a given set of experimental conditions. We show that these results are consistent with the existence of a transition zone linking the bilayer to its solid support and discuss the possible consequences of its presence.

2. Materials and methods

Montal-Mueller membranes were formed at room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) according to a technique described in detail by Tancrede et al. [12].

The membranes were formed on Teflon (Fluorocarbon, Dilectrix Division, Lockport, NY) partitions of various thicknesses, ranging from 6 to 25 μm . The aperture across the Teflon partition was punched using the perforating tool described by Robert et al. [13]. The quality of the hole punched was assessed by observation under a microscope ($100\times$, Wild Heerbrugg M11, Basel, Switzerland) and the diameter was precisely measured, to within 3%, using a calibrated eyepiece graticule. Depending on the film thickness, the diameters ranged from 230 to 240 μm . The membrane area used to calculate the specific capacitance was taken as equal to the hole area. Prior to use, the apertures were pretreated with a solution (1:50, v/v) of squalene (Eastman Kodak, Rochester, NY) in *n*-hexane (BDH, Ville St-Laurent, Québec).

Asymmetrical PE/PS bilayers were formed. PE (beef heart) was obtained from Serdary Research Laboratories (London, Ontario) while two different PS samples were used. One PS sample (beef brain) was obtained from Sigma (St. Louis, MO), the other (hydrogenated bovine) being purchased from Pharmacia P-L Biochemicals (Milwaukee, WI). The two samples gave identical results within experimental error. All the samples showed only one spot when checked for purity by thin-layer chromatography and were used without further purification. The lipids were spread at a nitrogen/water interface using approx. 50 μl of a 2 mM solution of lipid dissolved in hexane/ethanol (9:1, v/v). The spreading area was 60 cm^2 . Both hexane (BDH) and ethanol (Alcool de Commerce Limited, Gatineau, Québec) were distilled on a 30 cm high Vigreux column (Fisher, Montréal) prior to use and were found to be free of surface-active contaminants when checked on a classical Langmuir trough. The subphase on which the lipids were spread was 10^{-3} M phosphate buffer ($\text{pH} = 7.0 \pm 0.1$) containing 0.1 M NaCl as additional electrolyte. The salts were Baker Analyzed Reagent grade (purity better than 99%, Baker, Phillipsburg, NJ) and were used without further purification.

The capacitance measurement is made by comparing two RC networks in parallel. A diagram of the electrical circuit and a detailed account of the technique used are described by Robert et al. [13]. The accuracy and precision of the capacitance

measurements are found to be better than 2%. Besides the capacitance measurements which have been used to follow the build up of the membranes, our set up was also equipped with a stereomicroscope (80 \times , M3, Wild Heerbrugg) focused on the hole area, which also allowed visual monitoring of the build up of the membrane. It was also useful in adjusting very precisely the water levels across the membrane, the two water interfaces being both visible due to the transparency of the Teflon film. The capacitance values presented below are therefore those corresponding to a membrane across which there is no difference in hydrostatic pressure.

3. Results and discussion

We have measured the specific capacitance of PE/PS membranes for five different Teflon partition thicknesses, ranging from 6.4 to 25.4 μm . The experimental results are presented in table 1. The specific capacitance has a mean value of about 660 nF cm^{-2} for partition thicknesses in the range 6.4–12.7 μm . This mean value rises to 694 and 724 nF cm^{-2} when the partition thickness is increased to 19.0 and 25.4 μm , respectively. Although the experimental error in the capacitance values is rather large (see below for a further discussion of this point), a statistical evaluation of these data using the Student criterion shows the increase in capacitance to be clearly significant. Considering the number of experimental measurements performed for each thickness studied, the Student criterion gives a probability of confidence of 99.98% for the difference in capacitance being significant between 12.7 and 19.0 μm and 99.2% for values between 19.0 and 25.4 μm .

Clues as to the possible origin of this 10% increase in the specific capacitance of membranes prepared on partitions of greater thicknesses may be provided by an analysis of the various parameters involved in calculation of the specific capacitance. Indeed, the capacitance, C_M , of a membrane is given by

$$C_M = \frac{\epsilon_0 \epsilon_M A_M}{\delta_M}$$

Table 1

Specific capacitance of PE/PS membranes formed across partitions of various thicknesses

δ_p , Teflon partition thickness; C_M , specific capacitance (given as mean value \pm S.D.); N , number of membranes formed.

δ_p (μm)	C_M (nF cm^{-2})	N
6.4	661 \pm 50	54
9.5	665 \pm 25	38
12.7	663 \pm 44	55
19.0	694 \pm 42	49
25.4	724 \pm 48	25

where ϵ_0 represents the permittivity of a vacuum ($8.854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$), ϵ_M the membrane dielectric constant (usually taken as 2.2, corresponding to the hydrophobic core dielectric constant), A_M the membrane area and δ_M the hydrophobic thickness. It is not a simple task to pinpoint more precisely which of the geometrical (A_M , δ_M) or electrical (ϵ_M) factors are involved in the observed increase of capacitance. However, we know that the specific capacitance we measure for Montal-Mueller membranes refers to both bilayer and non-bilayer parts. Although the transition zone for Montal-Mueller membranes appears to be of small dimensions with respect to the bilayer [7,14,15], no systematic study has yet been performed related to the electrical characteristics of this transition zone and their effect on the properties measured for this type of membrane. On black lipid films however, White [16] has shown that the capacitance of the transition zone accounts for less than 1% of the membrane capacitance, as expected considering the probable size and overall dielectric properties of this region.

In the case of Montal-Mueller membranes, clues pertinent to the importance of the transition region can be obtained if one considers in detail the mode of formation of Montal-Mueller membranes which has been followed here by measurements of the capacitance during the course of membrane formation. Fig. 1 shows a typical variation of the capacitance recorded during the various phases of membrane formation. The capacitance is given as a function of the approximate volume of aqueous

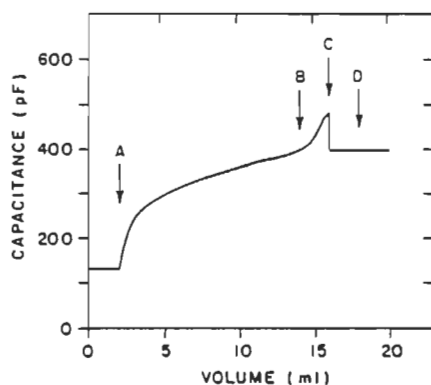


Fig. 1. Typical rise of capacitance during the formation of a membrane, plotted as a function of the approximate volume of aqueous solution added to the *cis* compartment to obtain a completely formed membrane. The various arrows (from A to D) refer to different time periods during the course of membrane formation, as described in the text.

solution added in one of the two troughs to obtain a completely formed membrane. The rather large volumes required reflect the overall dimensions of our troughs [12]. The x-axis is therefore a rough measure of the extent of membrane formation. Point A in fig. 1 corresponds to the situation where the water level in the *trans* compartment is raised over the aperture while that in the *cis* compartment is immediately below. The value of the capacitance at this point is related to the capacitance of the Teflon film separating the two aqueous compartments. When aqueous subphase is added to the *cis* compartment the capacitance begins to rise rapidly, subsequently slowing down as more solution is added. This rise in the capacitance corresponds to the value of the capacitance for a membrane of increasing area. When the bilayer is almost completed (point B) a rapid increase in capacitance (typically, about 10% of the capacitance measured) is observed (point C). Hansen [17] has also reported such a phenomenon for Montal-Mueller membranes. The shape of this overshoot in capacitance values between points B and D is extremely variable for different membranes prepared on any Teflon film thickness. Further discussion of this point will be presented below. Immediately after this overshoot, the final

value for the bilayer is recorded (point D). This value is then stable, to within a few percent, as a function of time on a scale of about 3 h. Furthermore, it shows no variation upon a sudden change in the applied voltage thus indicating that the bilayer is virtually solvent-free [7].

The critical moment governing formation of the bilayer, its stability and subsequent behaviour is clearly when the membrane closes off. At this point, the interface in the *cis* compartment reaches the top part of the aperture on which squalene, lipid and water molecules from the *trans* compartment are already present. It is most likely that these components form a microemulsion (probably in the form of inverted micelles) in the transition region, which is thought to represent the nature of the material surrounding the bilayer. For thermodynamic reasons, these inverted micelles would remain mainly in the transition region [18]. This situation is quite clear inasmuch as BLM are concerned [19–21]. It may not be very different for Montal-Mueller membranes, since it has been shown [11] that these membranes cannot be formed if such a transition region is absent. In confirmation of this point, it has been observed that Montal-Mueller membranes, in a similarly way to BLM [15,22], have been shown to possess a measurable lateral tension of a few mN m^{-1} [23].

The existence of this lateral tension in Montal-Mueller membranes has important consequences, since it affects directly the surface pressure within the bilayer. Evans and Waugh [24] have related these two parameters explicitly by $\pi = \gamma - \sigma$, π being the surface pressure, γ , the surface tension and σ , the lateral tension. Therefore, increasing the lateral tension by 1 mN m^{-1} decreases the surface pressure by 1 mN m^{-1} . In turn, if the surface pressure within the bilayer is changed, so will the area per molecule of lipid in the bilayer. Actually, one can quantify this effect by taking into account the recent lateral compressibility data reported by White and King [25] for egg phosphatidylcholine multilayers, from which one can calculate that a change of 1 mN m^{-1} in the surface pressure of the bilayer can produce a change in area per molecule of the lipid of about $0.5\text{--}1.0 \text{ \AA}^2$. This change does not seem large on an absolute basis but it has very im-

portant consequences inasmuch as capacitance measurements are involved. Indeed, this slight change in area per molecule of the lipid would be sufficient to affect the penetration of water molecules within the bilayer, close to its hydrophobic core (i.e., even within the carbonyl bonds of the lipid [26]), thereby modifying the position of the hydrophobic/hydrophilic barrier in the bilayer. This would have a large effect on the capacitance measurements. For example, a change of only 1.5 Å in the position of the barrier on each side of a bilayer 28 Å in thickness would change the capacitance values by about 11%. The argument presented here is similar, in principle, to that given by Bramhall [27] to rationalize the difference in fluorescence emission of probe molecules when present in the inner or outer monolayers of small lipid vesicles, or to that of Simon et al. [28] to explain the effect of cholesterol on the capacitance of bacterial PE Montal-Mueller bilayers.

If one now returns to table 1, bearing in mind the ideas put forward above, it becomes possible to rationalize the significant change in capacitance values observed when bilayers are prepared across apertures of different thicknesses. Indeed, we can reasonably assume that upon changing the thickness of the Teflon film across which the bilayers are formed, the volume of the transition region and, possibly also its composition will be different. Now, Gruen and Wolfe [20] have shown that the lateral tension in a BLM-type membrane is related to the composition as well as to the size of the micelles confined in the torus region. The change in lateral tension involved can reach a few mN m^{-1} , i.e., it corresponds to a large fraction of the actual tension measured in BLM or Montal-Mueller membranes. As explained above, this difference in tension would yield to measurable differences in capacitance values between membranes of the same lipid composition, but prepared on partitions differing in thickness.

It is also possible, by using the arguments presented above, to explain the rather large fluctuations in capacitance values measured for Montal-Mueller membranes. This is clearly observed in table 1, column 2, which shows the standard deviation of the capacitance with respect to the mean value for the five Teflon thicknesses

studied. The fluctuations in most cases are about $\pm 8\%$ of the mean capacitance values, much beyond the negligible variations recorded when calibration capacitors are used. These large fluctuations are also evident in the capacitance values reported by various authors, for either phospholipid membranes (table 2) or monoglyceride membranes of well-defined chain composition (table 3). We believe that these fluctuations for a given type of membrane reflect the fact that upon preparing various membranes under a given set of conditions, the transition region may vary slightly in composition, thus changing the lateral tension in the membrane. As a consequence, the thickness of the hydrophobic portion of the bilayer will vary as more or less water molecules would be allowed to penetrate further into the region of the first methylene groups close to the carbonyls. Furthermore, it should be recognized that the large fluctuations observed in the capacitance measurements of Montal-Mueller membranes or of BLM are inherent to the mode of formation of such membranes. In particular, for Montal-Mueller membranes it is clear that these membranes are not, and cannot, be formed under completely reproducible conditions. For example, it is not possible to spread the squalene coating

Table 2

Literature data on the specific capacitance of Montal-Mueller phospholipid membranes

DPG, diphosphatidylglycerol; PC, phosphatidylcholine; δ_p , Teflon partition thickness; C_M , specific capacitance; values of C_M are means \pm S.D., the number of membranes being given in parentheses when specified.

Composition	δ_p (μm)	C_M (nF cm^{-2})	Ref.
DPG/DPG		900 ± 20 (8)	30
PS/PS		700 ± 30 (12)	30
PC/PC	12.5	750 ± 50 (28)	31
PC/PC	12.5	760 ± 40	32
PE/PE	19.0	650 ± 10 (8)	7
PE/PS	19.0	720 ± 20 (11)	7
PE/PS	19.0	670 ± 30 (3)	7
PE/PE		630 ± 30	33
PE/PE		680 ± 10	14
PE/PS	12.5	700 ± 45 (32)	13

Table 3

Literature data on the specific capacitance of symmetrical Montal-Mueller monoglyceride membranes

MG, monoglyceride (chain length:unsaturation); δ_p , Teflon partition thickness; C_M , specific capacitance; values of C_M are means \pm S.D., the number of membranes being given in parentheses when specified.

Composition	δ_p (μm)	C_M (nF cm^{-2})	Ref.
MG (16:1)	12.5	847 ± 26 (34)	23
MG (18:1)	12.5	745 ± 24 (33)	23
MG (20:1)	12.5	657 ± 26 (27)	23
MG (18:1)	19.0	750 ± 30 (26)	7
MG (18:1)		790 ± 10	14
MG (16:1)	20.0	985 ± 45	34
MG (18:1)	20.0	852 ± 43	34
MG (20:1)	20.0	788 ± 40	34

around the aperture in exactly the same way. It is not possible either to punch the aperture and produce a hole that is exactly identical, at the molecular level, to one which has been punched previously. The membrane formed at the end may retain more or less lipid, squalene and water molecules so that either the volume of the transition region or, more likely, the composition of this transition region in terms of the size and number of inverted micelles may be different from membrane to membrane.

It is also important to note that the mean capacitance and fluctuation values reported in table 1 represent the average values for a large number of membranes (column 4) prepared on different days of experimentation using different Teflon partitions each time. We have indeed noted that the capacitance values obtained on a given day (i.e., on a given Teflon partition) are rather reproducible (e.g., to within \pm a few percent). However, the mean capacitance value for various days of experimentation may differ to a much greater extent (up to $\pm 8\%$ as shown in table 1) than the fluctuations recorded during a given day. This is due to the fact that a new Teflon film is used each time. The general conditions being slightly different each time, the capacitance values may be rather different in response to the variability in composition of the transition region and the consequence of this variability on the position of

the hydrophobic/hydrophilic barrier within the membrane. It is therefore most important to average out capacitance measurements over various film preparations in order to obtain significant results.

By using the same line of arguments, one can also rationalize the closing-off phenomenon, which was referred to as point C in fig. 1. As described above in brief, the rapid rise in capacitance values observed immediately before the final capacitance of the membrane is recorded can reach, typically, about 10% of the capacitance measured. However, this value is extremely variable and can be found to be much larger for some membranes, sometimes reaching values as high as 50% of the capacitance measured after the membrane is formed. This broad variability observed in the shape and amplitude of the closing-off phenomenon again reflects the fact that forming a Montal-Mueller membrane does not correspond to a true thermodynamic equilibrium process. In the very last step of formation, the membrane often builds up itself almost spontaneously, beyond the control of the experimenter. The large variability in the closing-off phenomenon may, at least in part, be related to the volume and composition (i.e., number and dimensions of the inverted micelles) of the transition region at the critical moment when the water level in the *cis* compartment reaches the top portion of the aperture. This particular composition may, to a large extent, affect the lateral tension of the almost completely formed bilayer and thus, via the mechanism described above, the capacitance values recorded at this point. It is also very likely, however, that in addition to this effect, other concurrent effects occur during the closing-off phenomenon (e.g., geometrical effects such as repositioning of the bilayer in the Teflon partition, which may affect the area of the bilayer).

In conclusion, the present work has explored the possibility that the transition region around the bilayer in Montal-Mueller membranes is likely to affect the capacitance values measured for such membranes. The effect is indirect in the sense that the composition of the transition region (which, for the reasons stated above, may be quite variable) will influence the lateral tension on the bilayer which, in turn, will ultimately result in re-

positioning of the hydrophobic/hydrophilic barrier, to which the capacitance values measured are so sensitively related. With the aid of such a mechanism, one can rationalize our experimental finding that the membrane capacitance varies as a function of the partition thickness across which they are prepared. It also rationalizes the large fluctuations in capacitance values usually found in the literature for such membranes as well as, at least in part, the closing-off phenomenon. Our results also draw attention to the fact that, for comparison of data between laboratories, the film thickness as well as the number of membranes and conditions prevailing should be given in detail.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council (Ottawa, Canada) and the Fonds F.C.A.R. (Québec) for financial support. One of us (M.B.) acknowledges the N.S.E.R.C. for a post-graduate scholarship.

References

- 1 P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien and W.C. Wescott, *Nature* 194 (1962) 979.
- 2 M. Montal and P. Mueller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (1972) 3561.
- 3 R. Latorre and J. Hall, in: *Membrane transport processes*, vol. 2, eds. D.C. Tosteson, Yu.A. Ovchinnikov and R. Latorre (Raven Press, New York, 1978) p. 313.
- 4 R. Fettiplace, D.M. Andrews and D.A. Haydon, *J. Membrane Biol.* 5 (1971) 277.
- 5 R.G. Ashcroft, H.G.L. Coster and J.R. Smith, *Biochim. Biophys. Acta* 643 (1981) 191.
- 6 A.D. Pickar and R. Benz, *J. Membrane Biol.* 44 (1978) 353.
- 7 O. Alvarez and R. Latorre, *Biophys. J.* 21 (1978) 1.
- 8 V.O. Pasechnik, *Biophysics* 28 (1983) 261.
- 9 I.N. Babunashvili, A.Ya Silberstein and V.A. Nenashev, *Stud. Biophys.* 83 (1981) 131.
- 10 P. Schoch and D.F. Sargent, *Biochim. Biophys. Acta* 602 (1980) 234.
- 11 S.H. White, D.C. Petersen, S. Simon and M. Yafuso, *Biophys. J.* 16 (1976) 481.
- 12 P. Tancrède, P. Paquin, A. Houle and R.M. Leblanc, *J. Biochem. Biophys. Methods* 7 (1983) 299.
- 13 S. Robert, P. Tancrède, A. Houle and R.M. Leblanc, *Photochem. Photobiol.* 41 (1985) 101.
- 14 J. Reyes and R. Latorre, *Biophys. J.* 28 (1979) 259.
- 15 L.V. Chernomordik, G.B. Melikyan, N.J. Dubrovina, I.G. Abidor and Y.A. Chizmadzhev, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 12 (1984) 155.
- 16 S.H. White, *Biophys. J.* 12 (1972) 432.
- 17 B.D. Hansen, Ph.D. Thesis, University of California at San Francisco, U.S.A. (1978).
- 18 S.B. Hladky and D.W.R. Gruen, *Biophys. J.* 38 (1982) 251.
- 19 S.H. White, in: *Ion channel reconstitution*, ed. C. Miller (Plenum Press, New York, 1986) p. 3.
- 20 D.W.R. Gruen and J. Wolfe, *Biochim. Biophys. Acta* 688 (1982) 572.
- 21 J.N. Israelachvili, S. Marcelja and R.G. Horn, *Q. Rev. Biophys.* 13 (1980) 121.
- 22 D. Needham and D.A. Haydon, *Biophys. J.* 41 (1983) 251.
- 23 R. Benz, O. Fröhlich, P. Lauger and M. Montal, *Biochim. Biophys. Acta* 394 (1975) 323.
- 24 E.A. Evans and R. Waugh, *J. Colloid Interface Sci.* 60 (1977) 286.
- 25 S.H. White and G.I. King, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 6532.
- 26 O.H. Griffith, P.J. Dehlinger and S.P. Van, *J. Membrane Biol.* 15 (1974) 159.
- 27 J. Bramhall, *Biochemistry* 25 (1986) 3479.
- 28 S.A. Simon, T.J. McIntosh and R. Latorre, *Science* 216 (1982) 65.
- 29 J.R. Smith, H.G.L. Coster and D.R. Laver, *Biochim. Biophys. Acta* 812 (1985) 181.
- 30 J.P. Laclette and M. Montal, *Biophys. J.* 19 (1977) 199.
- 31 M. Rich and S.S. Brody, *Z. Naturforsch.* 33C (1978) 735.
- 32 R. Fettiplace, *Biochim. Biophys. Acta* 513 (1978) 1.
- 33 L. Ebiara and J.E. Hall, *Biophys. J.* 28 (1979) 185.
- 34 I. Vodyanoy and J.E. Hall, *Biophys. J.* 46 (1984) 187.